

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**



**VARIANTES GENÉTICAS EN LA REGIÓN 3'UTR DE LOS  
GENES *BRCA1* Y *BRCA2* Y SU RECONOCIMIENTO POR miARNs  
EN CÁNCER DE MAMA Y OVARIO HEREDITARIO**

**Por**

**M. I. MARÍA MARISELA SÁNCHEZ CHAPARRO**

**Como requisito parcial para obtener el grado de  
DOCTOR EN CIENCIA CON ORIENTACIÓN EN  
INMUNOBIOLOGÍA**

**Julio, 2020**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**



**VARIANTES GENÉTICAS EN LA REGIÓN 3'UTR DE LOS  
GENES *BRCA1* Y *BRCA2* Y SU RECONOCIMIENTO POR miARNs  
EN CÁNCER DE MAMA Y OVARIO HEREDITARIO**

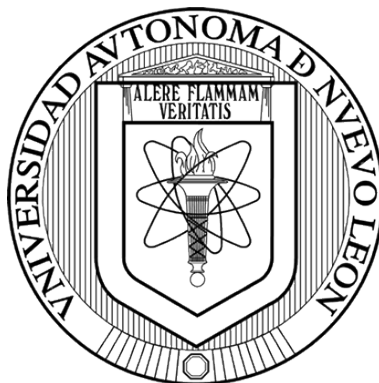
**Por**

**M. I. MARÍA MARISELA SÁNCHEZ CHAPARRO**

**Como requisito parcial para obtener el grado de  
DOCTOR EN CIENCIA CON ORIENTACIÓN EN  
INMUNOBIOLOGÍA**

**Julio, 2020**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**



**VARIANTES GENÉTICAS EN LA REGIÓN 3'UTR DE LOS  
GENES *BRCA1* Y *BRCA2* Y SU RECONOCIMIENTO POR miARNs  
EN CÁNCER DE MAMA Y OVARIO HEREDITARIO**

**Por**

**M. I. MARÍA MARISELA SÁNCHEZ CHAPARRO**

**Como requisito parcial para obtener el grado de  
DOCTOR EN CIENCIA CON ORIENTACIÓN EN  
INMUNOBIOLOGÍA**

**Julio 2020**

**VARIANTES GENÉTICAS EN LA REGIÓN 3'UTR DE LOS  
GENES *BRCA1* Y *BRCA2* Y SU RECONOCIMIENTO POR miARNs  
EN CÁNCER DE MAMA Y OVARIO HEREDITARIO**

**COMITÉ DE TESIS**



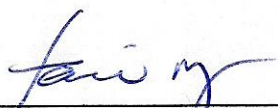
---

**Dra. Diana Reséndez Pérez**  
Presidente



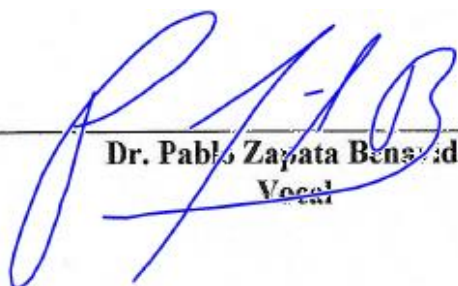
---

**Dra. Cristina Rodríguez Padilla**  
Secretario



---

**Dr. Fermín Mar Aguilar**  
Vocal



---

**Dr. Pablo Zapata Bensusán**  
Vocal

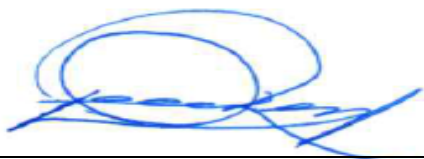


---

**Dra. Vianey González Villasana**  
Vocal

**VARIANTES GENÉTICAS EN LA REGIÓN 3'UTR DE LOS GENES  
*BRCA1* Y *BRCA2* Y SU RELACIÓN EN EL MECANISMO DE  
microRNA EN CÁNCER DE MAMA Y OVARIO HEREDITARIO**

**DIRECCIÓN DE TESIS**



---

**Dra. Diana Reséndez Pérez**  
**Director Interno**



---

**Dra. Laura Elia Martínez de Villarreal**  
**Director Externo**

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo con la beca nacional número 240918, otorgada para el desarrollo de mi programa doctoral y al Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica (PAICYT 2014) por el apoyo financiero para realizar esta investigación.

A la Facultad de Ciencias Biológicas, al Laboratorio de Inmunología y Virología, a cargo de la Dra. Cristina Rodríguez Padilla y al personal de la Subdirección de Posgrado por su infinito apoyo.

A la Dra. Diana Reséndez Pérez por brindarme la oportunidad de abrirme las puertas del Laboratorio en de Biología del Desarrollo, para realizar mi estancia formal de doctorado y retroalimentarme continuamente a través de sus seminarios. Por los consejos dados, tanto académicos, como personales, de los cuales estoy sumamente agradecida.

Agradezco a la Dra. Laura Elia Martínez de Villarreal por permitirme el acceso al Departamento de Genética y hacer uso de su equipo de biología molecular y secuenciador, así como brindarme apoyo a través del personal que labora con ella que me capacitó y apoyó para la realización de esta tesis.

Agradezco infinitamente al Dr. Irám Pablo Rodríguez Sánchez por creer en mí y brindarme ese apoyo incondicional por el valioso tiempo otorgado, por todas las asesorías de bioinformática y secuenciación. Por la amistad brindada y esa calidad humana que te caracteriza, además de aguantarme durante dos meses en tu casa al llegar a esta ciudad y apoyarme emocionalmente durante la pérdida de mi padre. No tengo como agradecértelo y me llevará toda la vida.

Al Dr. Omar Alejandro Zayas Villarreal que sin su trabajo clínico difícilmente hubiera logrado este trabajo. Gracias por tu dedicación y amor a tu trabajo como oncólogo e investigador, ya que tienes una gran calidad humana. A los doctores Fermín Mar Aguilar,

Vianey González y Mayra Gómez por sus consejos y asesorías metodológicas para esta tesis y resolver una gran cantidad de dudas.

Gracias a los doctores, técnicos y personal de laboratorio del Departamento de Genética (Facultad de Medicina) Gris, Alejandra, Azalia. También al personal y estudiantes de la Unidad de Biología del Desarrollo y Laboratorio de Inmunología y Virología Medicina, a Nancy, Citlali, Azeneth, Claudia, Rubén. Los quiero y admiro mucho.

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo de tesis doctoral a mis padres, que en todo momento confiaron en mí. Para mi madre, María de Jesús, que ha permitido que forje mi propio destino, con honestidad e integridad. A mi padre, José Concepción (†) que partió justo cuando iniciaba este trayecto, pero que siempre llevaré sus consejos en mi corazón. Gracias, padres, por haberme hecho tal y como soy. LOS AMO CON TODO MI SER.

A mi gran familia que sin su apoyo, cariño, amor incondicional, paciencia y orgullo, han esperado por mí. Que a la distancia me cuidan y envían lo mejor de su corazón. Pandita. Elo, Fer. GRACIAS POR TODO. Gerardo, Miguel, Víctor y Javier, gracias por estar al pendiente de cómo iba.

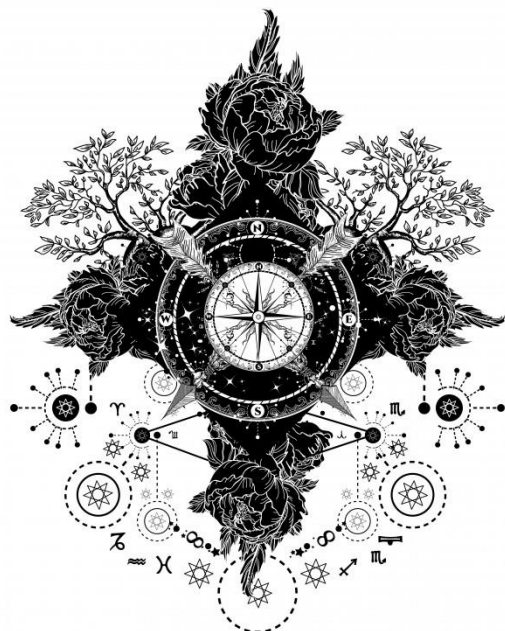
Dedico este trabajo también a mi segunda familia, que me ha recogido con los brazos abiertos y que se han adentrado de mi corazón. A mi pareja Jorge, que en las buenas y las malas siempre está ahí para mí, a su mamá Victoria, a Daniel y Diana que siempre están ahí para tenderme la mano. Dedico y agradezco a todas las personas que me estuvieron enseñando su manera de ver la vida y que me mostraron más cosas que solo conocimiento, a mis maestros y compañeros de posgrado.

A mis compañeros de laboratorio y los que conocí a través de este sitio por inspirarme a ir más allá de mis capacidades: Daniela, Eduardo, Rubén, Salomé, Claudia, Shamadi. A Julia Rosas, Lupita, Gabriela, Rocío y Ángel, Rusia, Alex, Elizabeth, a mis amigos que se convirtieron en mi familia regia al recibirme en una ciudad que yo no conocía y que se volvieron parte de mi corazón.



*“Si te sirve de algo nunca es demasiado tarde,  
o en mi caso demasiado pronto para ser quien  
quieras ser, no hay límite en el tiempo, empieza  
cuando quieras, puedes cambiar o no seguir  
igual. La vida no tiene reglas. Sácale provecho  
o desperdiciála, espero que la aproveches.  
Espero que veas cosas que te sorprendan, espero  
que sientas cosas que jamás hayas sentido,  
espero que conozcas a personas con opiniones  
diferentes, espero que estés orgullosa de tu vida.  
Y si descubres que no, espero que tengas la  
fortaleza para empezar de nuevo”*

*El curioso caso de Benjamín Button, 2008*



# ÍNDICE

COMITÉ DE TESIS .....	i
DIRECCIÓN DE TESIS .....	ii
AGRADECIMIENTOS .....	iii
DEDICATORIA .....	v
ÍNDICE .....	vii
ÍNDICE DE TABLAS .....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS .....	x
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS .....	xi
RESUMEN .....	xii
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. ANTECEDENTES .....	3
2.1 Síndromes de cáncer hereditario .....	3
2.2 Síndromes de cáncer de mama y ovario hereditario .....	4
2.3 Función y mecanismos de los genes <i>BRCA1</i> y <i>BRCA2</i> .....	7
2.3.1 Funciones del gen <i>BRCA1</i> y su proteína .....	9
2.3.2 Funciones del gen <i>BRCA2</i> y su proteína .....	10
2.3.3 <i>BRCA1</i> y <i>BRCA2</i> y su relación con los cánceres de mama y ovario .....	10
2.4 MicroARNs reguladores de la expresión de <i>BRCA1</i> y <i>BRCA2</i> en cáncer .....	12
2.5 Pruebas moleculares basadas en mutaciones de <i>BRCA1/2</i> .....	12
2.5.1 Limitaciones en el uso de <i>BRCA</i> como método de diagnóstico/pronóstico molecular ..	13
2.6 MicroARNs: Biogénesis y función biológica .....	14
2.6.1 Modificaciones <i>cis</i> y <i>trans</i> de los mecanismos de acción de microARNs .....	16
2.7 Mutaciones en sitios de unión a microARNs y efecto en el desarrollo de enfermedades	16
3. JUSTIFICACIÓN .....	18
4. HIPÓTESIS .....	19
5. OBJETIVOS .....	20
5.1 Objetivo general .....	20
5.2 Objetivos específicos .....	20
6. MATERIALES Y MÉTODOS .....	21
6.1 Lugar y área de estudio .....	21
6.2 Estrategia experimental .....	21
6.3 Descripción del estudio .....	21
6.3.1 <i>Criterios de selección</i> .....	22

6.4 Extracción de DNA genómico .....	23
6.5 Secuenciación de 3'UTR de <i>BRCA1</i> y <i>BRCA2</i> .....	23
6.5.1 <i>Obtención de productos amplificados</i> .....	23
6.5.3 <i>Parámetros de secuenciación</i> .....	25
6.5.4 <i>Análisis de secuenciación</i> .....	25
6.6 Análisis estadístico y clínico.....	26
<b>7. RESULTADOS</b> .....	<b>28</b>
7.1 Descripción de la población de estudio .....	28
7.2 Descripción alélica de los grupos de estudio .....	29
7.4 La presencia de cambios genéticos podría modificar los mecanismos de unión de diversos miARNs .....	31
7.5 Mecanismos <i>trans</i> de miARN afectan la regulación molecular y celular.....	34
<b>8. DISCUSIÓN</b> .....	<b>35</b>
<b>9. CONCLUSIONES</b> .....	<b>40</b>
<b>10. PERSPECTIVAS</b> .....	<b>41</b>
<b>11. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>42</b>
<b>RESUMEN BIOGRÁFICO</b> .....	<b>51</b>
<b>ANEXO 1</b> .....	<b>a</b>
<b>ANEXO 2</b> .....	<b>b</b>
<b>ANEXO 3</b> .....	<b>c</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Manejo clínico de pacientes con mutaciones en los genes BRCA .....	6
Tabla 2. Cebadores específicos para obtención de 3'UTR de <i>BRCA1</i> y <i>BRCA2</i> .....	24
Tabla 3. Cebadores internos para la secuenciación de los 3'UTR de <i>BRCA1/2</i> .....	25
Tabla 4. Descripción clínica de la población de estudio .....	28
Tabla 5. Comparación de las frecuencias genotípicas y alélicas de variantes entre el HBOC y los grupos de control por gen.....	29
Tabla 6. Pruebas de asociación entre variantes genéticas y HBOC .....	32
Tabla 7. Efecto <i>in silico</i> de variantes alélicas en las regiones de semillas de unión a miARNs .....	33

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Pedigrí de una familia con HBOC .....	5
Figura 2. Localización de los genes <i>BRCA1</i> y <i>BRCA2</i> en el genoma humano.....	8
Figura 3. Biogénesis y mecanismos canónicos y no canónicos de generación de microARNs.....	15
Figura 4. Estrategia experimental. ....	22
Figura 5. Identificación de variantes de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en las regiones 3'UTR de <i>BRCA1/2</i> .....	30
Figura 6. Mapa comparativo de miARNs unidos entre secuencias normales (WT) y mutadas.....	33

## LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

Ácido desoxirribonucleico	ADN
Ácido ribonucleico	ARN
Adenina	A
ADN de doble cadena	ADNss
ARN mensajero	ARNm
Cáncer de mama	CaMa
Cáncer de ovario	COv
Citosina	C
Guanina	G
Kilobases	kb
microARN	miARN
Marco de lectura abierta	ORF
Pares de base	bp
Producto amplificado	PA
Reacción en cadena de la polimerasa	PCR
Síndrome	Sx
Cáncer de mama y ovario hereditario, sx	HBOC
Timina	T

## RESUMEN

El síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario (HBOC) es una patología causada principalmente por mutaciones en los genes *BRCA1* y *BRCA2*. La región 3'UTR de los genes permite la unión de la mayoría de los microARNs involucrados en la regulación genética fina. El objetivo de esta tesis doctoral fue identificar variantes alélicas en los sitios de unión de miARN en las regiones 3'UTR en los genes *BRCA1* y *BRCA2* en pacientes diagnosticados con HBOC. La estrategia experimental consistió en coleccionar muestras de sangre de 50 pacientes con HBOC y de 50 controles de una población del Noreste de México y obtener el ADN genómico. Las regiones 3'UTR de *BRCA1* y *BRCA2* se amplificaron por PCR punto final y se secuenciaron para identificar variantes genéticas utilizando herramientas de bioinformática. Los resultados mostraron nueve polimorfismos (SNPs): cuatro en *BRCA1* (rs3092995 (C/G), rs8176318 (C/T), rs111791349 (G/A) y rs12516 (C/T)) y cinco en *BRCA2* (rs15869 (A/C), rs7334543 (A/G), rs1157836 (A/G) y rs75353978 (TT/del TT). También se identificó una nueva variante en la posición c.\*457 (A / C) en 3'UTR de *BRCA2*. Las variantes rs111791349-A, rs15869-C y c.\*457-C aumentaron el riesgo de HBOC en la población de estudio: (odds ratio (OR) rango 3.7-15.4;  $p < 0.05$ ). Las variantes genéticas en el 3'UTR de *BRCA1* y *BRCA2* aumentaron el riesgo de HBOC entre 3.7-15.4 veces en la población con esta condición. La presencia/ausencia de estos SNPs puede influir en la pérdida / creación de sitios de unión de miARN, como hsa-miR-1248 en *BRCA1* 3'UTR o el sitio de unión de la familia hsa-miR-548 en *BRCA2*. Estos resultados agregan nuevas pruebas de participación de miARN en la patogénesis de HBOC. En conclusión la presencia los SNPs rs8176318 (G/T), rs15869 (A/C) y la variante c.\*457 (A/C) fueron significativas y están relacionadas a un aumento en el riesgo en el grupo de HBOC. La nueva variante descrita en la región 3'UTR de *BRCA2*, tanto en pacientes HBOC como en los controles, ubicada en sitio c.\*457 posiblemente sea específica para población de la región del Noreste de México. Finalmente, el análisis *in silico* se postula la pérdida/creación de sitios de unión de miARN, como hsa-miR-1248 en *BRCA1* 3'UTR o el sitio de unión de la familia hsa-miR-548 en *BRCA2* que sugiere la participación de miARNs en la patogénesis del HBOC.

## ABSTRACT

Hereditary breast and ovarian cancer (HBOC) syndrome are mainly caused by mutations in the *BRCA1* and *BRCA2* genes. The 3'UTR region allows the binding of microRNAs, which are involved in genetic tune regulation. We aimed to identify allelic variants on 3'UTR miRNA-binding sites in the *BRCA1* and *BRCA2* genes in HBOC patients. Blood samples were obtained from 50 patients with HBOC and from 50 controls. The 3'UTR regions of *BRCA1* and *BRCA2* were amplified by PCR and sequenced to identify genetic variants using bioinformatics tools. We detected nine polymorphisms in 3'UTR, namely: four in *BRCA1* (rs3092995 (C/G), rs8176318 (C/T), rs111791349 (G/A), and rs12516 (C/T)) and five in *BRCA2* (rs15869 (A/C), rs7334543 (A/G), rs1157836 (A/G), and rs75353978 (TT/del TT)). A new variant in position c.\*457 (A/C) on 3'UTR of *BRCA2* was also identified. The following three variants increased the risk of HBOC in the study population: rs111791349-A, rs15869-C, and c.\*457-C (odds ratio (OR) range 3.7–15.4;  $p < 0.05$ ). Genetic variants into the 3'UTR of *BRCA1* and *BRCA2* increased the risk of HBOC between 3.7–15.4 times in the study population. The presence/absence of these polymorphisms may influence the loss/creation of miRNA binding sites, such as hsa-miR-1248 in *BRCA1* 3'UTR or the hsa-miR-548 family binding site in *BRCA2*. Our results add new evidence of miRNA participation in the pathogenesis of HBOC.



## 1. INTRODUCCIÓN

Los cánceres de mama y de ovario son las neoplasias más comunes entre las mujeres, y representan el 16% de todos los cánceres en las mujeres a nivel mundial; se estima un total de 1.38 millones de casos nuevos por año en todo el mundo (Oleg, 2019). Los síndromes de cáncer hereditario son trastornos caracterizados por un aumento superior al promedio en el riesgo de desarrollo de tejido específico de cáncer (Lynch et al., 2008). Las neoplasias de naturaleza hereditaria se desarrollan debido a mutaciones de la línea germinal en genes específicos. Entre estos tipos de cáncer se encuentran el síndrome de Li-Fraumeni, el cáncer gástrico hereditario, von Hippel-Lindau y los síndromes hereditarios de cáncer de mama y de ovario (HBOC) (Lynch et al., 2008; Dying et al., 2012; Pruthi et al., 2010). El síndrome HBOC es una enfermedad autosómica dominante de penetrancia incompleta, con la aparición de neoplasias en el seno y el ovario antes de los 40 años y es una forma agresiva de cáncer. Las mutaciones de la línea germinal en los genes *BRCA1* y *BRCA2* son las principales responsables del HBOC (Pruthi et al., 2010; Ramus et al., 2011).

*BRCA1* y *BRCA2* son genes supresores de tumores y están involucrados en los mecanismos de reparación de errores de ADN de doble cadena. Además de los genes *RAD51* y *p53*, están involucrado en la estabilidad y seguridad del genoma en los puntos de control del ciclo celular; aquellas células que no son capaces de repararse envían señales de muerte celular regulada, como apoptosis y arresto celular. Sin embargo, los errores en las funciones de las proteínas codificadas por *BRCA1/2* provocan proliferación celular (Ramus et al., 2011). Hay eventos reguladores que reducen la función de *BRCA1* y *BRCA2*, como la hipermetilación del promotor y la regulación postraduccional por microARN (miARN) (Moskwa et al., 2011; Yang et al, 2002). Los microARN (miARN) son moléculas de ARN no codificantes endógenas de 17 a 24 nt, capaces de ajustar la transcripción de aproximadamente el 50% de los genes de los organismos genómicos. Son un tipo de ARN interferente (RNAi) y su objetivo de acción está en las regiones 3'UTR de los genes (~90%), pero se ha encontrado que pueden regular secuencias ubicadas en 5'UTR y en regiones de marco de lectura abierto (ORF) (Sun 2013). Las secuencias de

miARN, así como sus genes blanco, están altamente conservadas en especies, principalmente de 7 a 8 nt en el sentido de 5', llamada "región semilla". Los miARN pueden degradar completamente el ARNm (complementación perfecta en el sitio de unión) o reprimir la traducción (complementación parcial). Debido al alto grado de conservación de las regiones de semillas y los sitios blancos, se ha observado que las mutaciones o los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en los sitios de unión de miARN son mecanismos de selección natural de organismos (Chen, 2006). Este mecanismo se puede observar cuando los SNP en las regiones 3'UTR de varios genes están involucrados en el desarrollo de enfermedades degenerativas, como el síndrome de Tourette, diabetes, cáncer en humanos y distrofias musculares en diferentes vertebrados (Clop et al., 2006; Ha, 2011).

La región noreste de México es un área particular donde la población tiene una alta tasa de mestizaje, debido al alto flujo migratorio entre los ancestros mestizos (características del centro y sur de México) y una alta mezcla genética entre las poblaciones americanas y europeas (principalmente española, judía Askenazi, franceses y alemanes) (Calderón-Garcidueñas et al., 2005). Los SNP se han identificado en regiones de genes 3'UTR *BRCA1* y *BRCA2* en poblaciones específicas. Estas variantes alélicas están asociadas con un mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama u ovario, principalmente en aquellas relacionadas con HBOC (Ertuck et al., 2006; Lheureux et al., 2011; Pelletier et al., 2011). Además, los SNP representan una forma de *trans*-regulación de miARNs que alteran la afinidad de mRNA debido a la creación o eliminación de sitios de unión, lo que podría resultar en mutaciones altamente heredables que producen los fenotipos asociados con el desarrollo de HBOC.

En esta tesis doctoral se realizó un estudio exploratorio en una población mexicana de la región Noreste de México para evaluar las variaciones alélicas en las regiones 3'UTR de los genes *BRCA1* y *BRCA2*, y para determinar si su presencia permite la aparición y/o eliminación de sitios de unión de miARN, y si las mutaciones están asociadas con el síndrome de HBOC.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Síndromes de cáncer hereditario

El Instituto Nacional de Cáncer (NIH, del inglés *National Intituto of Cancer*) define al síndrome de cáncer hereditario a aquellos trastornos hereditarios con un riesgo más elevado de la media de la población de desarrollar ciertos tipos de cáncer. Los síndromes son causados por mutaciones en ciertos genes que se transmiten consanguíneamente. El síndrome de cáncer hereditario presenta ciertas características observadas en las familias, como tener varios miembros cercanos de la familia (por ejemplo, una madre, una hija y una hermana) con el mismo tipo de cáncer, inicio temprano de neoplasias, o la presencia de dos o más tipos de cáncer en la misma persona. Algunos ejemplos de síndrome de cáncer hereditario son los síndromes de cáncer hereditario de mama y ovario, el síndrome de Li-Fraumeni, el síndrome de Cowden y el síndrome de Lynch. También se llama síndrome de cáncer heredado (NIH, 2015).

Los síndromes de cáncer hereditario tienen su origen en mutaciones genéticas aleatorias en el que una mutación de una línea germinal ya sea en el espermatozoide o en el óvulo, se introduzca en la composición genética de un individuo concebido de esa célula. Es más probable la mutación durante la espermatogénesis que en la ovogénesis, debido a la alta tasa de división celular que ocurre en el testículo (T. S. Frank 2001).

La mayoría de los genes responsables del desarrollo de malignidad se clasifican en oncogenes y genes supresores de tumores. cuando una copia mutada del gen genera una ventaja de crecimiento sobre otra con un gen normal, éste es considerado oncogén. Por el contrario, cuando la mutación genera la pérdida de la función normal de un gen se considera gen supresor de tumores. Sin embargo, una mutación en un gen supresor de tumores no es completamente perjudicial, ya que hay dos copias de un cromosoma y por lo tanto dos copias de gen. Debido a esto, para que se pueda perder la función de un gen supresor de tumores ambas copias deben ser inactivadas (Fearon 1997).

Aproximadamente el 5-10% de todos los cánceres son hereditarios, lo que significa que los cambios (o mutaciones) de determinados genes se transmiten de un pariente consanguíneo a otro. Las personas que heredan uno de estos cambios en los genes tendrán una mayor probabilidad de sufrir cáncer a lo largo de su vida. En la actualidad, se conocen mutaciones de varios genes que aumentan el riesgo de padecer diversos tumores; sin embargo, todavía no se han identificado las causas genéticas de todos los tipos de cáncer (Shulman 2010).

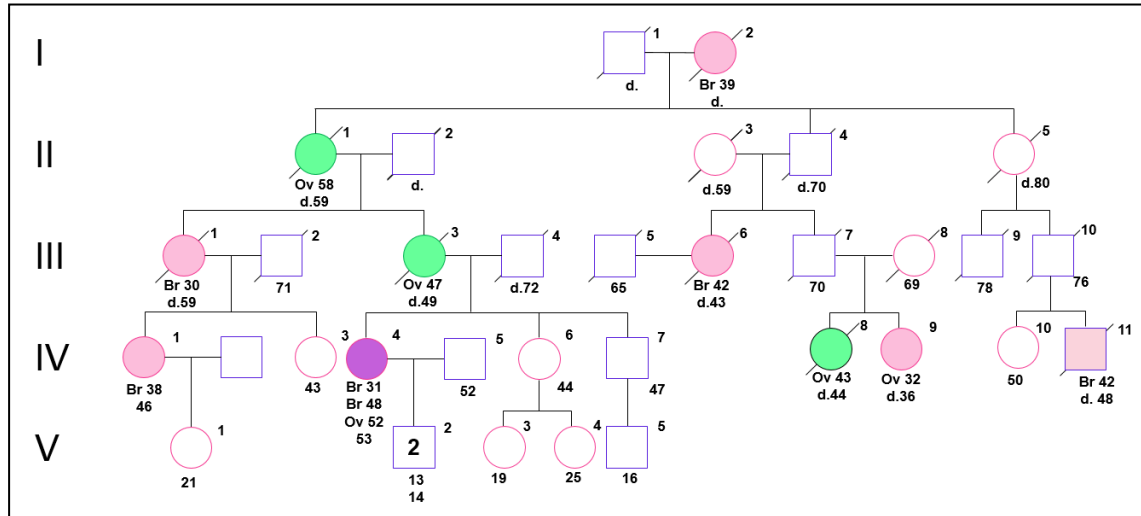
## **2.2 Síndromes de cáncer de mama y ovario hereditario**

El cáncer de mama (CaMa) y el cáncer de ovario (COv) son los tipos de neoplasia más frecuente entre las mujeres y representa el 16% de todos los casos de cáncer en mujeres a nivel mundial. Se estima un total de 1.38 millones de casos nuevos por año en el mundo (Bustreo and Chestnov 2015). En México, el CaMa y COv tienen el segundo y cuarto lugar, respectivamente, de prevalencia y el primero en mujeres de entre 30 y 59 años de edad. La principal morbilidad hospitalaria en nuestro país por neoplasias en mujeres se debieron al CaMa (29.6%), neoplasias en cervix y útero (16.7%) y de órganos digestivos (14.3%). Asimismo, los CaMa y COv son las principales causas de muerte por tumores (INEGI, 2019).

Se ha inferido que existe una susceptibilidad genética para el desarrollo de CaMa y COv, representada por una mayor incidencia de estos tumores en mujeres con antecedentes familiares y la observación de familias en las que múltiples miembros son afectados por alguno de estos tumores, conjuntándose éstas y otras características en un trastorno denominado como síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario (HBOC, del inglés *Hereditary Breast and Ovarian Cancer*) (Lynch et al. 2008).

El síndrome de HBOC se caracteriza por la aparición de neoplasias en personas menores de 40 años, cáncer diagnosticado de manera bilateral en las familias, carcinoma medular de mama, detección de varios miembros de una misma familia afectados y/o CaMa en un familiar varón como se muestra la Figura 1 (Shulman, 2010; Vaca-Paniagua et al., 2012).

Estos pacientes presentan un incremento en el riesgo del desarrollo de cáncer en seno, ovario, páncreas y de próstata en el caso de varones (Gronwald et al. 2008; Pruthi, Gostout, and Lindor 2010).



**Figura 1 Pedigrí de una familia con HBOC.** En este pedigrí se rastrea el HBOC a lo largo de cinco generaciones. La mujer (IV-1) tuvo CaMa a los 38 años y su madre (III-1) tuvo CaMa a los 30 años y su abuela (II-1) desarrolló COv a los 58 años. Por tanto, vemos cuatro generaciones afectadas por CaMa o COv. El individuo hombre (II-4) muere a los 70 años sin cáncer, tuvo una hija (III-6) con CaMa y dos nietas, una con COv (IV-8) y la otra con CaMa (IV-9). El hombre (IV-11) desarrolló CaMa a los 42 años. Lo que infiere que su padre (III-10) y su abuela (II-6) fueron portadores del gen mutado.

Estudios de familias y afectados han identificado mutaciones diferentes de los genes *BRCA1* y *BRCA2* principalmente en la línea germinal. Estos genes aportan una predisposición genética para CaMa y COv, como lo es el HBOC (Gronwald et al. 2008). El grupo de mutaciones relacionadas al HBOC puede transmitirse a la siguiente generación a través de un patrón autosómico dominante de penetrancia incompleta, provenientes de la madre o lado paterno, con lo que cada descendiente de un portador de variantes de *BRCA* tiene un 50% de transmitir la mutación a su descendencia (Jatoi and Anderson 2008).

La prevalencia de cáncer de mama en mujeres con mutaciones en los genes *BRCA1* y *BRCA2* no se ha establecido con certeza y varía entre poblaciones y genealogías

(Petrucelli, Daly, and Pal 1993). Sin embargo, en estudios de familias de alto riesgo han revelado que las mujeres que albergan una mutación en el gen tienen dos posibilidades, el riesgo de por vida en 87% de desarrollar o el de 20 – 44% para COv. Los sobrevivientes de cáncer de mama con mutaciones heredadas, ya sea en *BRCA1* o *BRCA2* corren un riesgo significativamente mayor de desarrollar un segundo CaMa, COv y otros tipos de cáncer. Como se ha mencionado, los hombres que llevan una mutación *BRCA1* o *BRCA2* tienen un mayor riesgo de desarrollar neoplasias en mama, próstata, y páncreas (Pruthi, Gostout, and Lindor 2010; Quiyono et al. 2012)

La OMS afirma que la detección temprana es una estrategia fundamental para el diagnóstico, tratamiento y control oportuno de cáncer en la población (Bustreo and Chestnov 2015). El manejo que debe realizarse para un paciente y su diagnóstico confiable, abarcan parámetros como la detección de mutaciones con alto riesgo al desarrollo de CaMa/COv tanto en él como en su familia, ya sea completa o al menos el 50% de las mujeres que la conforman, con la finalidad brindar un sistema de diagnóstico y tratamiento que no pueda reduzca a los parámetros de manejo y vigilancia actualmente realizados como se muestra en la Tabla 1 (McLaughlin et al. 2007; Bash 2009).

**Tabla 1. Manejo clínico de pacientes con mutaciones en los genes *BRCA***

INTERVENCIÓN	ÓRGANO	RECOMENDACIÓN
<b>Incremento en la vigilancia</b>	<b>Mama</b> <b>Ovario</b>	Autoexamen mensual de mama desee los 18 años Examen clínico de mama anual o semianual. comienzan a los 25 años. La mamografía anual y la resonancia magnética a partir de los 25 años. Ecografía transvaginal anual o semianual y pruebas de CA-125 para detectar el COv que comienza a los 25 años.
<b>Quimioprevención</b>	<b>Mama</b> <b>Ovario</b>	Los fármacos como el tamoxifeno reducen significativamente el riesgo de CaMa tanto en portadores de la mutación afectados y no afectados. Los anticonceptivos orales se asocian con una reducción de hasta un 60% el riesgo de COv.
<b>Cirugía profiláctica</b>	<b>Mama</b> <b>Ovario</b>	La mastectomía preventiva se asocia con una reducción del >90% de riesgo de CaMa. La eliminación preventiva de los ovarios y las trompas proporciona aproximadamente una reducción del riesgo del 96% para el COv y de hasta un 68% de reducción en el riesgo de CaMa (si se realiza en mujeres premenopáusicas).

El diagnóstico molecular de las mutaciones en los genes *BRCA* se realiza principalmente cuando existe un alto grado de sospecha clínica, basada principalmente en la historia familiar de cáncer en primero y segundo grado de parentesco (Ding et al. 2012; Rakha, Reis-Filho, and Ellis 2008). Los portadores de mutaciones en el gen *BRCA1* son más

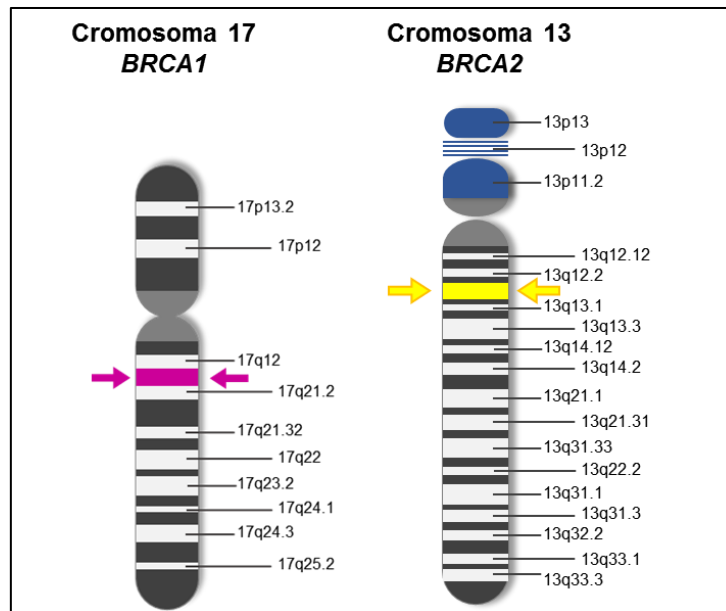
propensos a desarrollar cáncer de mama de fenotipo triple negativo, cuyos tumores no expresan receptores de estrógenos (ER), receptor de progesterona (PR), o factor de crecimiento epidérmico humano receptor 2 (HER2). El fenotipo triple negativo está asociado con una edad de inicio más temprana, un grado nuclear más elevado, grado de diferenciación histológico más pobre, desarrollo temprano de metástasis y una disminución en la supervivencia (Dent et al. 2007; Atchley et al. 2008).

Usualmente las células de seno la glándula mamaria y/u ovario, que tienen mutaciones en los genes *BRCA*, tienen procesos anormales de reparación del DNA, y de la proliferación y diferenciación celular. Este comportamiento es exacerbado por estimulación endógena y exógena por parte de estrógenos, en diferentes etapas del desarrollo humano, como la pubertad, el embarazo y por tratamientos hormonales (Antoniou et al. 2003; Andrieu et al. 2006). Si bien, muchos otros factores están asociados a desarrollo de ambos tipos de malignidad, los portadores de las mutaciones en genes mencionados presentan un riesgo más elevado a la media establecido (McLaughlin et al., 2007).

### **2.3 Función y mecanismos de los genes *BRCA1* y *BRCA2***

Como se ha mencionado anteriormente, se han identificado dos genes principales que confieren susceptibilidad del desarrollo de HBOC, estos son los genes *BRCA1* y *BRCA2*, los cuales se encuentran en los cromosomas 17 y 13, respectivamente (Figura 2).

El locus del gen *BRCA1* se encuentra en la región 17q12.21 del genoma y tiene una longitud aproximada de 100 kb del ADN genómico; se constituye por 24 exones, de los cuales 22 son traducidos. La transcripción de *BRCA1* genera un producto de ARNm primario de 7.8 kb, de los que se traducen 5,592 nt para generar una proteína de 1863 aminoácidos (Miki et al. 1994). El gen *BRCA2*, que se encuentra en el cromosoma 13 (13q12.3); lo componen aproximadamente 70 kb de ADN genómico, contiene 27 exones, de los que se transcriben 26. Genera un ARNm de 14.5 kb de longitud y éste es traducido a una proteína de 3418 aminoácidos (Tavtigian et al. 1996).



**Figura 2. Localización de los genes *BRCA1* y *BRCA2* en el genoma humano.** En el diagrama se indican los locus para *BRCA1* y *BRCA2* en flechas rosas y amarillas, respectivamente. Aunque ambos genes se encuentran localizados en diferentes cromosomas y locus y puedan tener diferentes alelos, las mutaciones en ambos genes produce el mismo fenotipo de propensión al desarrollo de cáncer.

*BRCA1* y *BRCA2* fueron aislados y secuenciados en 1994 y 1995, respectivamente. El conocimiento de la función molecular de ambos genes implícita en el desarrollo de CaMa y COv, tanto esporádico como hereditario, permitió el desarrollo de técnicas diagnósticas y pronósticas para estas patologías. Inicialmente, el gen *BRCA1* se relacionó en un análisis en familias con casos de CaMa detectado a edades tempranas. Sin embargo, hasta identificación de las mutaciones truncadas en el ORF de este gen se confirmó esta asociación. No obstante, las mutaciones en *BRCA1* no explicaban los casos en familias con CaMa en varios varones. En 1995 se relacionó el gen *BRCA2* a este evento y además de encontrar una asociación con el desarrollo de cáncer de próstata, ovario y otros órganos.

Ambos genes se expresan normalmente en las células de CaMa y otros tejidos, donde ayudan en la reparación de DNA dañado o inducir la destrucción las células si el ADN no puede ser reparado. También se ha sugerido que las proteínas de ambos genes regulan la actividad de otros genes y juegan un papel crítico en el desarrollo embrionario. *BRCA1* y *BRCA2* están involucrados en la reparación del daño cromosómico con un papel importante en la reparación libre de errores en rompimientos de ADN de doble cadena



(ADNss). Debido a estas funciones, estos genes se clasifican como genes supresores de tumores, específicamente genes de vigilancia o *caretaker*, es decir, que codifican productos que estabilizan el genoma. (Friedenson 2007). Esto lo logran mediante la prevención de la acumulación de mutaciones propias del proceso de replicación del ADN en el ciclo celular. Las mutaciones en los genes *caretaker* provocan inestabilidad genómica, generando células tumorales (S. A. Frank 2003).

### **2.3.1 Funciones del gen *BRCA1* y su proteína**

El gen *BRCA1*, en colaboración con otros genes supresores de tumores, perciben daños en el ADN que transforman en señales para formar un complejo de proteínas de múltiples subunidades, conocido como el complejo de vigilancia genoma asociado a BRCA1 (BASC, por sus siglas en inglés) (Wang et al. 2000). La proteína BRCA1 se asocia con la RNA polimerasa II, través del dominio C-terminal, además interacciona con los complejos de histona desacetilasa. Por lo que esta proteína está involucrada en procesos transcripcionales, de la reparación de rompimiento de ADNss, ubiquitinación, entre otras funciones nucleares (Starita and Parvin 2003).

La proteína BRCA1 se une directamente al ADN y tiene una mayor afinidad por las estructuras de ramificadas. Esta capacidad permite inhibir la actividad de nucleasa del complejo MRN, así como de MRE no acomplexada. Esto explica el rol de BRCA1 de promover una baja fidelidad de reparación del ADN en los extremos no homólogos (NHEJ, por sus siglas en inglés) (Paull et al. 2001; Durant and Nickoloff 2005). Se ha visto que BRCA1 co-localiza con la proteína  $\gamma$ -H2AX (histona H2AX fosforilada en la serina-139) en los focos de reparación de ADNss, lo que puede indicar que existe una función de reclutamiento de factores de reparación.

BRCA1 participa en diversos procesos de reparación del ADN, tales como reparación de ADNss por recombinación homóloga, en la que la reparación utiliza un molde de la secuencia homóloga intacta idéntica que se encuentra en la cromátide hermana, ya sea desde un cromosoma homólogo o en el mismo cromosoma, dependiendo del ciclo celular. Varias proteínas, incluyendo BRCA1, reparan el complejo de ADN-histonas formado en

el núcleo para su reparación. Esta proteína, junto con *BRCA2* y *RAD51* mantienen la estabilidad genómica en eventos de rompimientos de ADNss causado por radiación natural, el intercambio de material genético exógeno. También interviene en reparaciones de mal apareamiento o *mismatch* del ADN, al trabajar en conjunto con la proteína *MSH2*

### **2.3.2 Funciones del gen *BRCA2* y su proteína**

A pesar de que *BRCA1* y *BRCA2* se encuentran en distintos locus y cromosomas, tienen funciones interrelacionadas, ya que también la proteína *BRCA2* trabaja junto con *RAD51* en la reparación de ADNss. Para que *RAD51* pueda ser reclutada en el rompimiento de ADNss, debe de formarse un complejo formado por *BRCA1*-*PALB2*-*BRCA2* (Xia et al. 2006). Como se ha mencionado, los rompimientos ocurren por la exposición natural a radiaciones y en el intercambio de material genético en células germinales durante la meiosis.

La proteína *BRCA2* contiene 39 aminoácidos repetidos que son críticos en la unión a *RAD51* y a la resistencia a tratamientos de metilmetanosulfonato. Entre los dominios de mayor importancia, el dominio Tower puede adoptar una estructura secundaria, formada por un par de  $\alpha$ -hélices antiparalelas (base) que soporta tres hélices en el extremo (3HB) en el extremo. 3HB un motivo de hélice-motivo-hélice similar a los dominios de recombinasas a unión al ADN de bacterias y a los factores de transcripción de homodominios en eucariotas. El dominio Tower se involucra en la función supresora de tumores y en la unión de *BRCA2* al ADN (Yang et al. 2002).

### **2.3.3 *BRCA1* y *BRCA2* y su relación con los cánceres de mama y ovario**

La pérdida de la función de los genes supresores de tumores, como los tratados en este trabajo, puede inducir la generación de neoplasias. No obstante, para que esto ocurra los dos alelos deben estar alterados para la pérdida total de la función protectora. Las mutaciones pueden generarse en el transcurso de la vida del individuo y/o de manera heredada. Las mutaciones heredadas o germinales se encuentran en los óvulos o espermatozoides, por lo que los individuos son portadores de la o las mutaciones en la totalidad de las células (incluidas las somáticas) (Díez Gilbert 2006).

*BRCA1* se expresa en menor cantidad en COv del subtipo esporádico epitelial, que es el más frecuente, específicamente en la subcategoría de COv seroso, causando deficiencias en la reparación homóloga. Éstas desencadenan una cascada de señalización molecular que forman COv seroso de alto grado (Bowtell 2010). Particularmente para *BRCA1*, se ha observado una baja o nula expresión de este gen en la mayoría de los casos de CaMa ductal de alto grado. Esto se debe a la acumulación de mutaciones de la línea germinal y/o la baja expresión génica, reflejándose en la inducción de neoplasias; la reducción de la expresión de *BRCA1* se observa tanto en CaMa esporádico como hereditario. Debido a que las células afectadas carecen de la proteína BRCA1, los daños genómicos se reparan por otras vías menos eficientes, generando mutaciones y reordenamientos cromosómicos brutos que pueden conducir a la progresión a CaMa (Wilson et al. 1999; Jacinto and Esteller 2007).

Por el contrario, la mayoría de las variaciones encontradas en *BRCA2* ha sido asociadas a HBOC, así como en otras enfermedades como la anemia de Falconi (Reuter et al. 2003). Aunque las mutaciones en *BRCA1* y *BRCA2* están asociados al riesgo de desarrollo de CaMa (incluidos varones), los cambios en este último gen incrementan el riesgo de cánceres en ovario, trompa de Falopio, páncreas, próstata y melanoma maligno (Levin, Lech, and Friedenson 2012).

Frecuentemente los carcinomas mamarios asociados a mutaciones en *BRCA1* presentan fenotipo basal (triple negativo para receptores hormonales y HER2) y expresan citoqueratinas basales 5/6 y factor de crecimiento epidérmico. Estos tumores representan un reto desde el punto de vista terapéutico, ya que no pueden ser manejados con tratamientos hormonales, ni anticuerpos anti-HER2, por lo que la única opción es la quimioterapia.

Se ha observado un efecto terapéutico con el uso de inhibidores PARP como terapia molecular dirigida contra clonar tumorales portadora de mutaciones en *BRCA1/2*, debido a que la polimerasa poli-ADP-ribosa (PARP) interactúa en el reclutamiento de las

proteínas *BRCA1/2* en el proceso de la reparación del ADN en clonas tumorales portadoras de mutaciones en estudios clínicos fase 1.

#### **2.4 MicroARNs reguladores de la expresión de *BRCA1* y *BRCA2* en cáncer**

Una de las principales causas de la reducción en la expresión de *BRCA1* y *BRCA2* son los eventos epigenéticos, entre los que se encuentran la hipermetilación de los promotores y la acción de microRNAs (miARNs), estos últimos, de relevancia en nuestra investigación. Se ha visto que la sobreexpresión determinados miARNs específicos para CaMa y para COv reprimen la expresión de estos genes, y que esto se encuentra vinculado a un fenotipo o subtipo específico de neoplasia. Para CaMa se ha visto que ha-miR-182 se expresa hasta 100 veces más que en tejido normal, mientras que ha-miR-146b-5p se presenta principalmente en fenotipos triple negativo, siendo este último miARN un regulador tanto de *BRCA1* como de *BRCA2*; en el caso del COv, el otro lado ha-miR-182 y ha-miR-9 se encuentran asociados a estadios tardíos (IIIC y IV) y fenotipos de cáncer seroso. Por otro lado miR-146a ha demostrado tener un papel regulador tanto para ambos genes como ambos tipos de cáncer. (Moskwa et al. 2011; Garcia et al. 2011; Sun et al. 2013).

#### **2.5 Pruebas moleculares basadas en mutaciones de *BRCA1/2***

Para los síndromes de cáncer hereditario se estima que entre el 5 al 10% de los casos de neoplasias tienen un origen de predisposición hereditaria, así como un 15-20 % con agregación familiar, donde varios miembros de la familia desarrollan cánceres sin un patrón claro de herencia mendeliana (Valdespino-Gómez y Valdespino-Castillo, 2016). El principal desafío para estos síndromes, como el HBOC, es la aplicación de los avances de la genómica del cáncer con un beneficio clínico.

Para pacientes con el síndrome de HBOC, el estudio molecular de las mutaciones de *BRCA1/2* es actualmente el único recomendado en la aplicación clínica, ya que estos genes también aumentan el riesgo de desarrollar cáncer de páncreas y próstata. Las familias con alto riesgo de cáncer de mama y ovario hereditario requieren consulta oncológica

molecular, análisis de los genes *BRCA1* y *BRCA2*, medidas de seguimiento clínico personalizado y de ser positiva la mutación de los genes, un estudio integral de los familiares susceptibles con riesgo elevado para desarrollar HBOC (Valdespino-Gómez y Valdespino-Castillo, 2016; Vidal-Millán, 2008).

El equipo del Dr. Weitzel desarrolló en 2014 un panel de 114 mutaciones recurrentes con validación por secuenciación amplificación de sonda dependiente de ligadura múltiple (MLPA) específico para poblaciones hispanas, denominado HISPANEL. Este panel que incluye inserciones/deleciones y mutaciones puntuales recurrentes en estas poblaciones para utilizarse en la plataforma MassArray de Sequenom®. La información preliminar indica una sensibilidad del panel cercano al 80%, comparado con la secuenciación completa de los genes *BRCA*, con una precisión del 100% de las mutaciones (Weitzel et al. 2013; Alemar et al. 2016). Esta información sugiere que el uso de este panel logra la detección de mutaciones recurrentes de *BRCA*. Además de HISPANEL, existen opciones de secuenciación masiva y paneles que ofrecen diversas compañías para la determinación de mutaciones específicas.

### **2.5.1 Limitaciones en el uso de *BRCA1/2* como método de diagnóstico/pronóstico molecular**

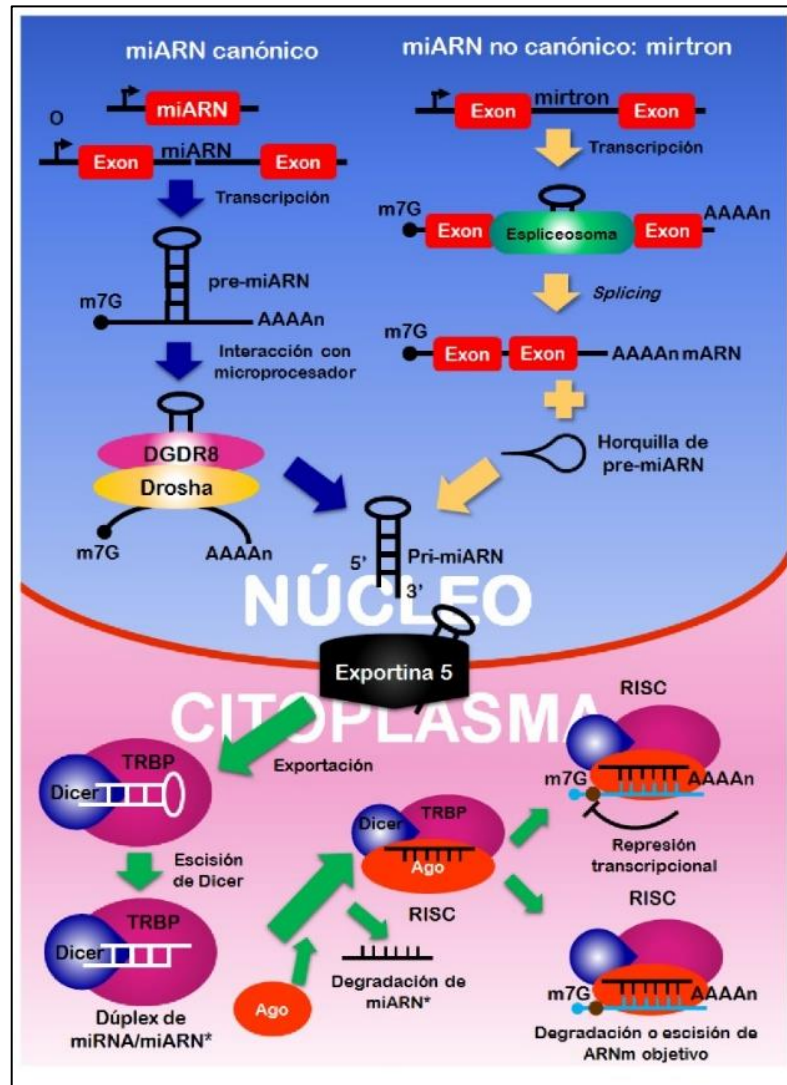
Uno de los aspectos a tomar en cuenta en los métodos de diagnóstico de HBOC es que la prevalencia de mutaciones de los genes *BRCA1/2* es moderadamente diferente en diversas poblaciones. Por ejemplo, poblaciones de ascendencia judía askenazi es importantemente mayor, lo cual se asocia con una mayor incidencia de cáncer de mama. Así como la misma presencia de variantes genéticas específicas de poblaciones, razas y naciones (Schubert et al., 1997).

Aunado con que las pruebas moleculares, deben buscar mejorar los precios de diagnósticos genéticos mediante la evaluación de mutaciones específicas de regiones y las más frecuentes, se suma que solo se consideran los SNPs y variantes localizadas en los ORFs de los genes, restando interés a zonas de alta conservación por su papel regulador como son los UTRs.

## 2.6 MicroARNs: Biogénesis y función biológica

El área de la regulación génica ha sido una de las áreas de estudio con mayores adelantos en el campo de la biomédica; uno de estos avances ha sido el descubrimiento de los microARNs (miARNs). Los miARNs son cadenas de ARN de simple cadena de 20-22 nt de longitud. La función primaria de estas moléculas es la regulación de los ARN mensajeros (ARNm) a través de la hibridación éstos en sus regiones 3'- no traducibles (3'UTR: *Untranslated region*), lo que da como resultado en la represión y/o degradación del ARNm blanco (Wightman, Ha, and Ruvkun 1993; Friedman et al. 2009).

La biogénesis de los miARNs está ampliamente descrita en la literatura científica (Zeng 2006) (Figura 3). En cuanto al mecanismo de funcionamiento, básicamente una cadena de miARN se acopla a una proteína llamada Argonauta 2 (Ago2) y juntas forman el complejo de inducción de silenciamiento del RNA (RISC: *RNA-induced silencing complex*). El complejo RISC es el responsable de la catálisis del ARNm, causando su represión traduccional. En el caso de los mamíferos, los miARN reconocen sus sitios de complementariedad en las secuencias 3'UTR (Lewis, Burge, and Bartel 2005). Gran parte de los ARNm regulados por estas moléculas tienen una función en el ciclo celular, diferenciación, entre otros procesos esenciales, que en conjunto equivalen casi una tercera parte de los ARNm humanos (He et al. 2005).



**Figura 3. Biogénesis y mecanismos canónicos y no canónicos de generación de miARNs.**

Los miARNs pueden ser generados por exones codificantes o intrones. Ambas vías producen moléculas de ~21 nt de longitud. En animales, los miARNs hibridan por complementación imperfecta a los sitios 3'UTR de los RNA mensajeros, unión que induce el silenciamiento genético.

En el área de inmunología, los miARNs se han asociado a una amplia gama de procesos biológicos, entre ellos están los mecanismos de señalización asociados a la respuesta inmune innata y adaptativa, el desarrollo y diferenciación de células inmunes, etc. La deficiencia en la síntesis y función de estos reguladores ha relacionado con la alteración del sistema inmunológico y entre las consecuencias asociadas se encuentran la pobre supresión de malignidades y autoinmunidad (Kusenda et al. 2006). Varias perspectivas relacionadas con miARN son intensamente estudiadas, como la organización genómica, la biogénesis y los mecanismos dirigidos a moléculas específicas. En este caso, el proceso

de reconocimiento de secuencias objetivo es una clave importante para la red de regulación que llevan a cabo los miARNs.

### **2.6.1 Modificaciones *cis* y *trans* de los mecanismos de acción de microARNs**

Los cambios en la regulación que afectan la actividad de un miARN pueden ser causados por factores *cis* y *trans*. Específicamente en los factores *trans* se encuentran las mutaciones en las proteínas relacionadas en la transcripción de los genes de miARN, procesamiento, focalización y polimorfismos en los sitios de reconocimiento de miARN de los ARNm de una proteína blanco (Sethupathy and Collins 2008).

### **2.7 Mutaciones en sitios de unión a microARNs y su efecto en el desarrollo de enfermedades**

Existen muchas mutaciones están vinculados a un mayor riesgo de HBOC en mujeres portadoras de un gen *BRCA1* y 2 anormal. Existen reportes en los que se han determinado SNPs que modifican el riesgo de desarrollo de COV en portadoras de mutaciones en estos genes (Pruthi, Gostout, and Lindor 2010; Ding et al. 2012).

Como se ha mencionado, los miARN se unen por complementariedad imperfecta a sus objetivos, sin embargo, conservan un perfecto grado de hibridación en los primeros 7-8 nt del extremo 5' del miARN, la cual se le denomina “región semilla” (Lewis, Burge, and Bartel 2005). Es esta región en donde la presencia de un SNP puede generar un mecanismo aberrante de función de miARN. El número de reportes en donde el hallazgo de SNPs en los sitios de unión a estas moléculas se ha incrementado. En su mayoría, concluyen que estas mutaciones tienen una repercusión en diversas patologías, como hipertrofia muscular en corderos, síndrome de Tourette, susceptibilidad a la infección de VIH-1 (virus de inmunodeficiencia humana-1), e incremento de riesgo de desarrollo de cáncer de mama en humanos (Clop et al. 2006; Pontillo et al. 2010; Pelletier et al. 2011).

Entre los estudios realizados se encuentra un análisis de cohorte realizado por Smits *et al.*, (2011), en el que se observaron SNPs en la región 3'UTR del gen *KRAS* desregulaba la



función del miARN *let-7* y este efecto se asociaba en el desarrollo de cáncer colorrectal. Además, se sugería el uso de este SNP en el proceso de diagnóstico temprano de esta patología. En otro trabajo, se evaluó el control de la sobreexpresión de receptores de estrógenos alfa ( $ER\alpha$ ) que es un factor de riesgo para desarrollo de cáncer de mama. Se demostró que el SNP rs93410170 en el gen  $ER\alpha$ , permitía la unión del miR-206, y este a su vez repercutía en la disminución de la proteína; no obstante, frecuencia alélica de la mutación es menor al 30% de la población lo cual puede ayudar al desarrollo de marcadores (Adams *et al.*, 2008).

Aunado a esto, se ha visto que el SNP rs1044129 (A>G) en la región 3'UTR del gen *RYR3* encontrado en población China, afecta la regulación que lleva a cabo miR-367. El gen *RY3* codifica para proteínas formadores canales de  $Ca^{+2}$  que permiten crecimiento, morfología y migración de células cancerosas de mama (Zhang *et al.*, 2011). Adicionalmente, en un estudio de casos y controles se ha identificado que los SNPs rs799917 en *BRCA1* y rs1799782 en *XRCC1*, modifican la interacción con miR-187 y miR138, respectivamente. Los autores mostraron con estas mutaciones, que la población tiene un riesgo significativo para el desarrollo de cáncer de mama (Nicoloso *et al.*, 2010).

### 3. JUSTIFICACIÓN

Los genes *BRCA1* y *BRCA2* han sido un pilar en el desarrollo de pruebas moleculares para la determinación de polimorfismos y han sido ampliamente usados en la clínica oncológica con la finalidad de integrarlo al diagnóstico y pronóstico de un paciente. No obstante, el conjunto de diversos SNPs no es sólo característicos de una patología, sino se diferencian poblaciones concretas de un área geográfica.

La identificación de mutaciones en cánceres hereditarios es de gran utilidad, ya que los familiares de los pacientes podrán beneficiarse de medidas eficaces no solo en la detección precoz, sino también en la prevención de los tumores por parte de protocolos de consulta oncogenética, que es un proceso estructurado de evaluación y comunicación de los problemas integrales asociados con la susceptibilidad hereditaria de padecer cáncer.

Visto desde la comprensión de mecanismos moleculares implicados en la propensión, control y desarrollo de esta enfermedad se hallan los miARNs, que como se ha visto tienen un papel de gran importancia en el control de una amplia red de señalización y control celular e inmunológica, y que además elementos *cis*, como SNPs en los sitios de unión a miARN en genes claves, están implicados en el pronóstico de cáncer en los pacientes de HBOC.

#### **4. HIPÓTESIS**

Las variaciones alélicas en las regiones 3'UTR de los genes *BRCA1* y *BRCA2*, permiten la aparición y/o eliminación de sitios de unión a miARNs, las cuales se encuentran asociadas al desarrollo de síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario en pacientes en riesgo del noreste de México.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general

Identificar mutaciones en las regiones 3'UTR de los genes *BRCA1* y *BRCA2* y determinar modificaciones en el mecanismo biológico de los microARNs en pacientes con síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario en una población originaria del noreste de México.

### 5.2 Objetivos específicos

- Identificar las mutaciones en las regiones 3'UTR de los genes *BRCA1* y *BRCA2* en las pacientes del noreste de México.
- Predecir los posibles sitios de unión a miARNs en las mutaciones identificadas en los genes mencionados, así como los miARN relacionados por medio de análisis *in silico*.
- Asociar e integrar los datos analizados para identificar los sitios de unión a miARN relacionados a HBOC, así como el análisis estadístico de asociación epidemiológica entre SNPs en los sitios de unión a miARNs con HBOC en pacientes del Noreste de México.

## **6. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.1 Lugar y área de estudio**

El presente trabajo fue realizado en la Unidad de Biología del Desarrollo (UBD) del Laboratorio de Inmunología y Virología (LIV) de la Facultad de Ciencias Biológicas. El análisis de interacción *in vitro* de miARNs se realizó en colaboración con el Departamento de Genética de la Facultad de Medicina, ambas de la Universidad Autónoma de Nuevo León mediante secuenciación de 3'UTRs.

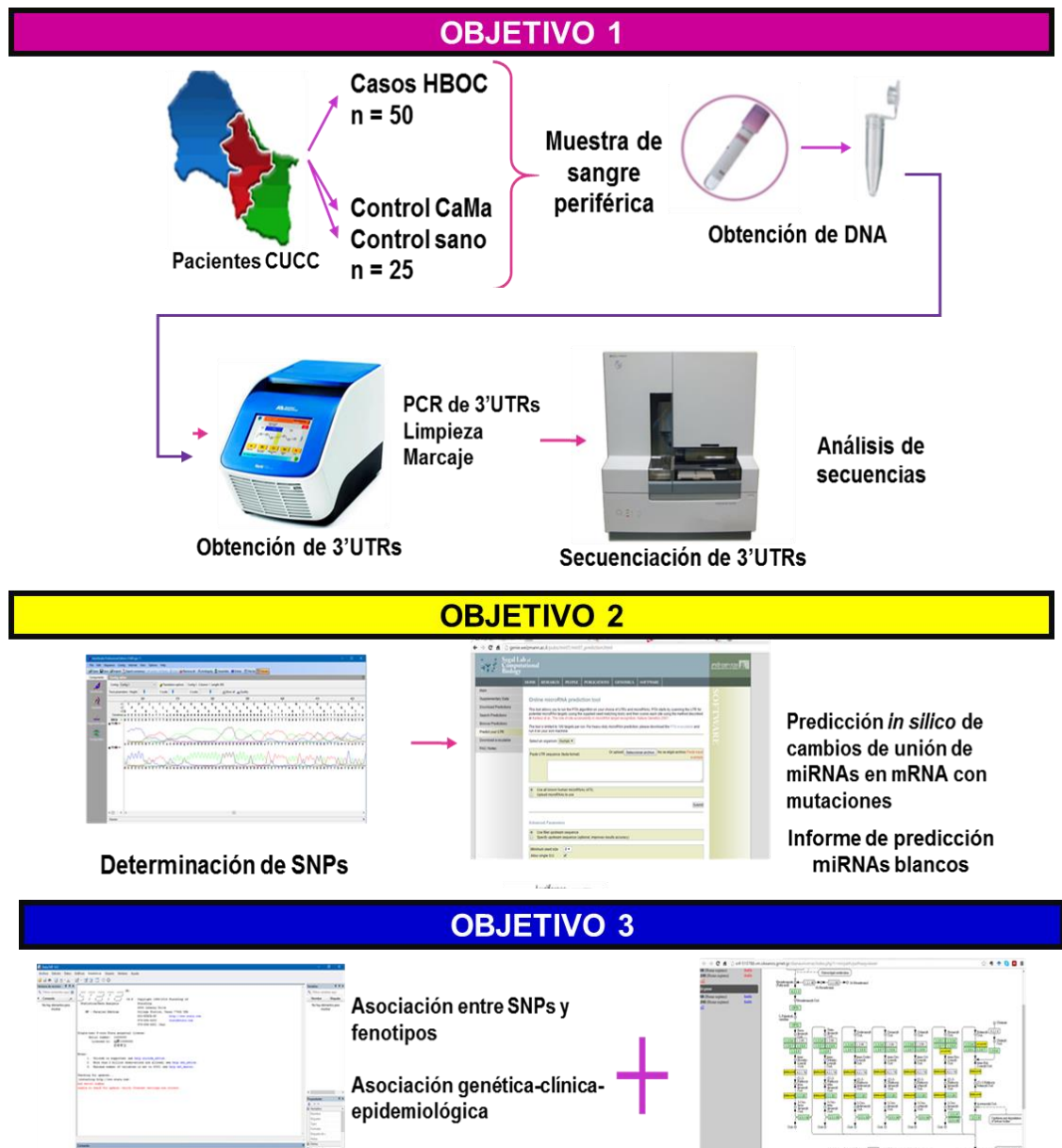
### **6.2 Estrategia experimental**

Para la realización de este trabajo, cada uno de los objetivos planteados fue dividido en metas o secciones metodológicas para una mejor distribución del trabajo (Figura 4).

### **6.3 Descripción del estudio**

Se realizó un estudio observacional, transversal correlacional. Este protocolo fue sometido y aprobado por Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, y se le asignó la clave de proyecto G15-003. La recolección de datos fue retrolectiva; los pacientes fueron mediante expediente electrónico, previamente tratados el Centro Universitario Contra el Cáncer (CUCC), ubicado en la Facultad de Medicina. Se seleccionaron casos con características descritas en criterios de inclusión específicos (Tabla 4), así como casos con sospecha de asociación genética familiar.

Posteriormente fueron entrevistados de manera telefónica para confirmación de datos en el historial médico. Tras acceder al participar en el estudio, los pacientes fueron entrevistados en el CUCC por el Dr. Omar Zayas para la actualización del expediente clínico, firma de consentimiento y toma de muestra de sangre periférica.



**Figura 4. Estrategia experimental.** El diagrama de flujo muestra principales metodologías a desarrollar para la ejecución de cada objetivo propuesto para el desarrollo de esta tesis.

### 6.3.1 Criterios de selección

En el grupo de casos (mujeres con datos clínicos de HBOC) los criterios de inclusión para este grupo fue el diagnóstico confirmado de cáncer de mama primario,  $\leq 45$  años en el momento del diagnóstico y antecedentes familiares de cáncer de mama u ovario en ( $\geq 3$  familiares).

Para el grupo de controles se analizaron muestras provenientes de mujeres clínicamente sanas con una estimación de riesgo <1% utilizando la herramienta de cálculo Gail. Todos los pacientes nacidos en la región noreste de México (Coahuila, Nuevo León y Tamaulipas), incluyendo su ascendencia en primer grado. Aquellas muestras sanguíneas o de ADN insuficientes o de mala calidad o con datos incompletos fueron descartadas.

#### **6.4 Extracción de DNA genómico**

Se aisló y purificó el DNA a partir de sangre periférica, utilizando el estuche comercial DNA isolation from blood, serum and plasma (Cat. D1244-10, de Qiagen), siguiendo las especificaciones del fabricante. La calidad de las muestras fue verificada midiendo la relación A230/260 que tuvieran valores entre 1.9 a 2.1, utilizando un Nanodrop (Thermo Scientific™). El material genómico fue concentrado a 45 ng/μL, en eluciones de 100 μL y almacenado a -20°C hasta su amplificación por PCR.

#### **6.5 Secuenciación de 3'UTR de *BRCA1* y *BRCA2***

Debido a que la mayoría de los paneles de secuenciación de *BRCA1* y *BRCA2* sólo abarcan regiones codificantes, se optó por utilizar la técnica de secuenciación por electroforesis capilar, utilizando fragmentos previamente amplificados por PCR.

##### **6.5.1 Obtención de productos amplificados**

Se diseñaron cebadores (primers) específicos para 3'UTR de cada gen de interés, utilizando las secuencias proporcionadas por GenBank para *BRCA1* (NM\_007294.3) y *BRCA2* (NM\_000059.3) (Anexos 1 y 2) y el software PrimerBlast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) para obtener un producto amplificado (PA) de 1420 bp y 902 bp, para cada gen respectivamente (Tabla 2).

**Tabla 2. Cebadores específicos para obtención de 3'UTR de *BRCA1* y *BRCA2***

GEN/OLIGONUCLEÓTIDO	SECUENCIA DE 5'→3'	TM	TAMAÑO
<b>BRCA1_Fw</b>	ACCTGATAXCCCCAGATCCCC	60°C	1420 bp
<b>BRCA1_Rv</b>	TTTGGAAGTGTGCTACCAGG	62°C	
<b>BRCA2_Fw</b>	GAACAGGAGAGTTCCCAGGC	62°C	920 bp
<b>BRCA2_Rv</b>	AATCAGTGCCAATTGAAAGCA	60°C	

Se prepararon reacciones que contenían JumpStart™ *Taq* ReadyMix (Cat. P2893, Sigma-Aldrich) al 2x, 1 µL de cada oligonucleótido a 10 µM y 50 ng de DNA templado y se completó la reacción con agua libre de nucleasas a un volumen final de 30 µL. El programa de PCR consistió en un ciclo de 94°C × 4 min, 35 ciclos de desnaturalización 94°C × 1 min, alineación 60°C × 30 s y de extensión de 72°C × 1 min; y finalmente un ciclo de extensión final de 72°C × 6 min.

Los PA obtenidos se limpiaron utilizando el reactivo USB® ExoSAP-IT® PCR Product Cleanup (Cat.78200, Affimetrix). Se tomaron 5 µL de PA y se agregaron 2 µL de ExoSAP-IT. La mezcla fue incubada a 37°C × 15 min y posteriormente a 80°C × 15 min para inactivar el reactivo.

### **6.5.2 Marcaje y limpieza de productos amplificados**

Los PA correspondientes a las regiones 3'UTR de *BRCA1* y 2 fueron marcadas para secuenciación por electroforesis capilar, utilizando la plataforma de Applied Biosystem. El estuche comercial BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing (Cat. 4337455, Applied Biosystem) fue utilizado para este propósito. Debido a que la resolución del capilar es de ≈ 500 bp, se optó por realizar la amplificación de fragmentos cortos para una mejor precisión en la lectura, se diseñaron primers internos a la secuencia amplificada previamente (Tabla 3).

La reacción contenía 1 µL de BigDye, 2 µL de buffer, 1 µL de oligonucleótido (30 ng/µL), 3.5 µL de PA y se completó con agua miliQ a un volumen final de 10 µL. La mezcla se colocó en el termociclador para realizar el marcaje. El programa consistió en un ciclo de 96°C × 1 min, 25 ciclos de 96°C × 10 s, 50°C × 5 s y 60°C × 4 min.



**Tabla 3. Cebadores internos para la secuenciación de los 3'UTR de *BRCA1/2***

GEN	PRIMER	SECUENCIA DE 5'→3'	T <sub>m</sub>
<i>BRCA1</i>	B1_1	ACCTGATAXCCCCAGATCCCC	60°C
	B1_2	ATCCAAGCACTCTCCTTCC	57.3°C
	B1_3	CCTGTGTTTACAAAGGCAGA	62.0°C
	B1_4	TGATCTTGGCTCACTGCAAC	57.3°C
	B1_5	GGCAGGAGAATCACTTCAGC	57.9°C
	B1_6	GCAACAGCTTCCTTCCTGGTGGG	56.1°C
	B1_7	GGAAAATGAACTAGAAGAGATTT	58.0°C
	B1_8	AGGCTCTGAGAAAGTCGGCT	60.0°C
<i>BRCA2</i>	B2_1	GAACAGGAGAGTTCCCAGGC	62.0°C
	B2_2	CCCACCTCAGCTTCTCAAAG	57.3°C
	B2_3	GGTGGCTCATGCCTGTAATC	57.9°C
	B2_4	TTGCTCAAAAGGAAACACCA	56.1°C
	B2_5	CAGTTATTTGATGCAGATTCC	58.0°C
	B2_6	AATCAGTGCCAATTTGAAAGCA	60.0°C

Los productos resultantes fueron purificados o almacenados hasta su limpieza, protegidos de la luz y a -20°C. La purificación de los PA marcados se realizó con el kit BigDye X-Terminator (Cat. 4376486, Applied Biosystem). Al tubo con PA marcado se le agregaron 28.5 de buffer SAM y 6.5 de BigDye X-Terminator, cuidando en todo momento de homogeneizar las perlas de este último. Se incubó la reacción en un agitador a 1800 rpm × 1 h en oscuridad y posteriormente, se centrifugó a 1000 g × 2', previo a colocar la muestra en la placa de 96 pozos para la secuenciación.

### 6.5.3 Parámetros de secuenciación

Para la secuenciación por electroforesis capilar se utilizó el secuenciador ABI 3130xl Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystem), un capilar de 36 cm (Cat. 4333464, Applied Biosystem) y el polímero POP-4 polymer para el secuenciador 3130/3130xl (Cat. 4363750, Applied Biosystem). Cada corrida (4 pozos) utilizó ≈ 40 µL de POP-4, el cual debía suministrarse antes de comenzar el procedimiento de secuenciación. Las secuencias obtenidas y electroferogramas fueron analizados en el programa GeneStudio™ Professional de distribución libre.

### 6.5.4 Análisis de secuenciación

Las secuencias obtenidas después de la secuenciación prueba se almacenaron en formato FASTA para su posterior análisis. Los resultados de la secuenciación se compararon con las secuencias reportadas de los genes *BRCA1* y *BRCA2*. La relación entre las variantes

conocidas y el riesgo de HBOC se verificó utilizando los programas bioinformáticos y de apoyo en línea Ensemble Genome Browser (ENSEMBL; [www.ensembl.org/](http://www.ensembl.org/)), la Base de datos de Mutaciones Genéticas Humanas (HGMD; [www.hgmd.cf.ac.uk/ac/all.php](http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/all.php)), y la Sociedad de Variaciones del Genoma Humano (HGVS; [www.hgvs.org/dblist/dblist.html](http://www.hgvs.org/dblist/dblist.html)). La base de datos de polimorfismos (dbSNP) ([www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP)) también fue consultada para obtener información sobre variaciones genéticas.

### **6.5 Predicción *in silico* de sitios de unión a miARNs**

Para el análisis de sitios de unión a miARNs, se utilizaron diversos predictores en línea, ya que cada uno tiene diferentes criterios para determinar que un miARN hibrida en un sitio específico. Se utilizó el software en línea PITA del Instituto de Ciencia Witzmann ([http://genie.weizmann.ac.il/pubs/mir07/mir07\\_prediction.html](http://genie.weizmann.ac.il/pubs/mir07/mir07_prediction.html)), que es un predictor basado en la hibridación en la región semilla de miARN en un 3'UTR y en el programa PITA que permite agregar más parámetros de análisis, tales como desapareo individual, hibridación Watson-Crick, etc. Se consideró los cambios en unión de miARNs a una secuencia de mRNA, cuando el  $\Delta G$  era  $\geq$  a -5.0

### **6.6 Análisis estadístico y clínico**

Los cálculos de frecuencia simples de las variables de riesgo de HBOC y las características clínicas de los participantes del estudio se determinaron mediante recuentos directos y se expresaron como porcentajes y medias  $\pm$  desviación estándar. El análisis estadístico y generación de gráficas se realizó en GraphPad.

Para la evaluación de la posible relación entre genotipos/alelos y HBOC utilizando el programa SNPstat ([www.snpstats.net/start.htm](http://www.snpstats.net/start.htm)) del Instituto de Oncología de Cataluña (Cataluña, España). Se estimaron los odd ratios (OR) para cada variante de genotipo.

El equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) se analizó utilizando un software en línea. En los estudios de casos y controles, se utilizó el software en línea para *Test for deviation from Hardy-Weinberg equilibrium and test for association* (<https://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>); los valores de  $p \leq 0.05$  fueron considerados significativos.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Descripción de la población de estudio

Un total de 50 pacientes se caracterizaron clínicamente con HBOC; la edad media para el diagnóstico de cáncer de mama fue de 37.28 años. El 34% de los casos tenía al menos un estado doble o triple negativo (TNC) en los receptores de estrógenos (ER), progesterona (PR) y receptores del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2 / neu); este hallazgo coincide con lo reportado en la literatura haciendo estas pacientes candidatas a terapias agresivas, en conjunto a la intervención quirúrgica. Los datos descriptivos de los pacientes HBOC, se muestran en la tabla 4.

**Tabla 4. Descripción clínica de la población de estudio**

ASPECTO CLÍNICO	%	ASPECTO CLÍNICO	%
<b>Edad de diagnóstico (año)</b>	37.28 ± 3.30	<b>Estadificación TNM</b>	
<b>Índice de masa corporal (kg/m<sup>2</sup>)</b>	$\bar{x} = 27.76 \pm 5.59$	I A	4%
<b>Sobrevida libre de enfermedad</b>		I B	10%
>36 meses	29%	II A	16%
<36 meses	21%	II B	20%
Sin dato	50%	III A	34%
<b>Menarquía</b>	11.77 ± 2.48	III B	4%
<b>Menopausia</b>		III C	4%
Yes	38%	IV	6%
No	62%	<b>Metástasis</b>	
<b>Anticonceptivos orales</b>		Hueso	10%
SI (Uso >5 años)	74%	Visceral	2%
No	20%	Hueso y, visceral	2%
<b>Criterio de inclusión</b>		Hueso, visceral, nudo linfático	2%
Antecedentes familiares	41%	<b>Estado de receptor</b>	
Diagnostico >45 años	59%	ER <sup>+</sup> PR <sup>+</sup> HER2 <sup>+</sup>	10%
<b>Partos</b>		ER <sup>+</sup> PR <sup>+</sup>	40%
0	20%	ER <sup>+</sup> HER2 <sup>+</sup>	2%
1 o 2	54%	HER2 <sup>+</sup>	6%
3-5	20%	ER <sup>+</sup>	4%
>5	3%	Triple negativo	34%
<b>Método de detección</b>		<b>Terapia</b>	
Autoexploración	88%	<b>Quimioterapia</b>	
Hallazgo clínico	2%	AC(4)-Taxol(12)	28%
Mastografía	4%	Antraciclinas	18%
<b>Tabaquismo</b>		Taxanos	10%
Si	78%	Capecitabina	2%
No	22%	No especificado	10%
<b>Histología</b>		Sin quimioterapia	32%
Ductal infiltrante	74%	<b>Radioterapia</b>	
Carcinoma medular	4%	Adyuvante	76%
Lobulillar	2%	Paliativa	2%
Ductal/Lobulillar	2%	Adyuvante/Paliativa	2%
<b>Grado de diferenciación celular</b>		Sin radioterapia	16%
Bien diferenciado (G1)	6%	<b>Terapia hormonal</b>	
Moderadamente diferenciado (G2)	28%	Si (Tamoxifen)	54%
Escasamente diferenciado (G3)	36%	Sin terapia hormonal	42%
No es posible asignar grado (Gx)	28%		

Por otro lado, el 64% presentaban una diferenciación celular moderada o escasamente diferenciado (G2 y G3), lo cual también coincide con el aspecto de que estos tumores

## 7.2 Descripción alélica de los grupos de estudio

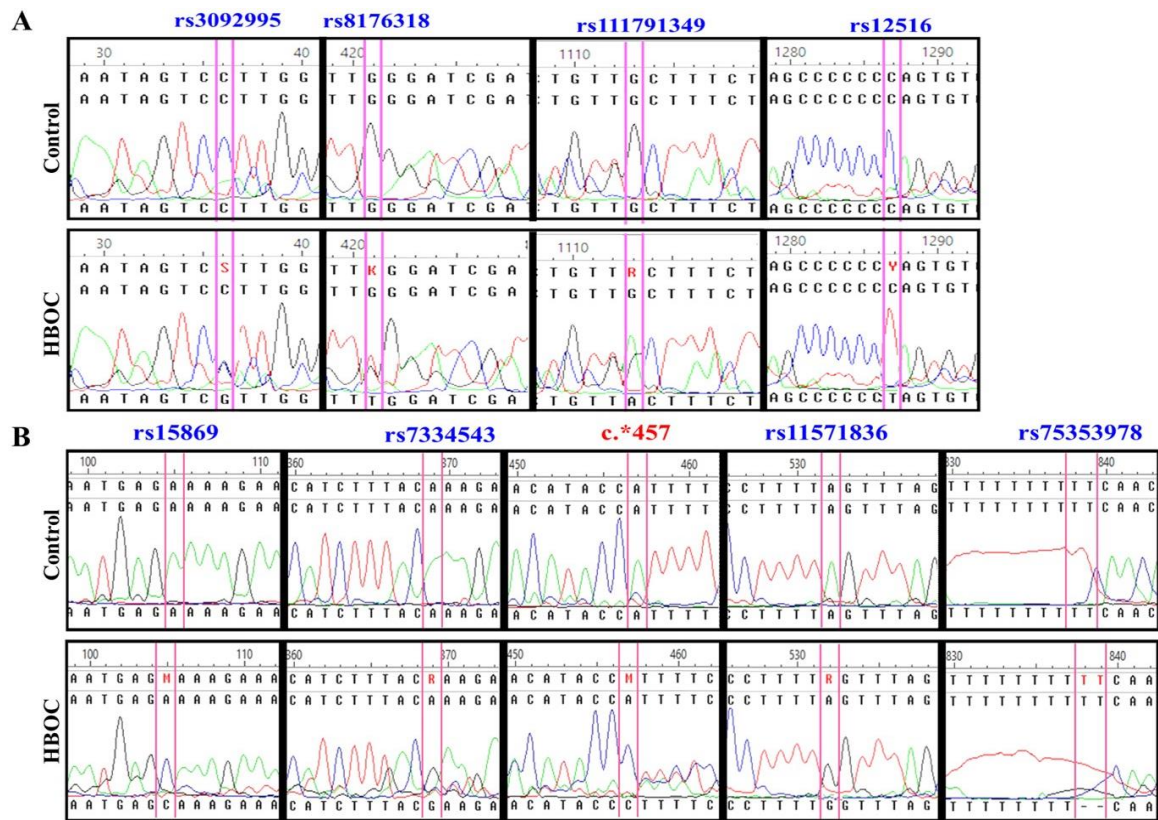
En esta investigación se identificaron nueve variantes alélicas en la región 3'UTR de los genes *BRCA1* y *BRCA2* (Figura 5). Para la región secuenciada en 3'UTR *BRCA1* los SNPs fueron rs3092995 (C/G), rs8176318 (C/T), rs111791349 (G/A) y rs12516 (C/T) para. Con respecto a 3'UTR de *BRCA2* se encontraron los SNPs rs15869 (A/C); rs7334543 (A/G); rs1157836 (A/G); rs75353978 (TT/delTT) y la variante alélica c.\*457 (A/C). Los porcentajes de frecuencia genotípica y la frecuencia alélica menor (MAF) se muestran en la Tabla 5.

**Tabla 5. Comparación de las frecuencias genotípicas y alélicas de variantes entre el HBOC y los grupos de control por gen**

GEN	VARIANTE	GRUPO HBOC				CONTROLES			
		Frecuencia genotípica		MAF		Frecuencia genotípica		MAF	
<i>BRCA 1</i>	rs3092995	C/C	C/G	G/G	G	C/C	C/G	G/G	G
		82%	0%	18%	18%	76%	8%	16%	20%
	rs8176318	C/C	C/T	T/T	T	C/C	C/T	T/T	T
		84%	10%	6%	11%	90%	10%	0%	5%
	rs111791349	G/G	G/A	A/A	A	G/G	G/A	A/A	A
<i>BRCA 2</i>		68%	12%	20%	26%	76%	18%	6%	15%
	rs12516	C/C	C/T	T/T	T	C/C	C/T	T/T	T
		82%	4%	14%	16%	84%	16%	0%	8%
	rs15869	A/A	A/C	C/C	C	A/A	A/C	C/C	C
		84%	6%	10%	13%	82%	18%	0%	9%
	rs7334543	A/A	A/G	G/G	G	A/A	A/G	G/G	G
		94%	0%	6%	6%	94%	0%	6%	6%
	c.*457	A/A	A/C	C/C	C	A/A	A/C	C/C	C
		66%	12%	22%	28%	68%	30%	2%	17%
	rs11571836	A/A	A/G	G/G	G	A/A	A/G	G/G	G
		82%	4%	14%	16%	82%	14%	40%	11%
	rs75353978**	TT/TT		delTT		TT/TT		delTT	
		32%		68%	32%	92%		8%	8%

\* MAF = Frecuencia del Alelo Menor. \*\* rs75353978 SNP es la delección de la bases TT, y se indica como delTT.

La cambio alélico c.\*457 A/C es una nueva una variante que hasta el momento no ha sido reportada en algún banco genes y/o población. Se propone que estos alelos son específicos de la población analizada, ya que tanto en controles, como en el grupo de estudio se detectó este cambio. Se puede presumir que esta variante alélica es específica de la población mexicana, al menos, aquella que pertenece a la región Noreste de México.



**Figura 5. Identificación de variantes de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en las regiones 3'UTR de *BRCA1/2*.** Las variantes alélicas de cada región 3'UTR se identificaron comparando los alelos que portaban el HBOC y pacientes sanos; las leyendas azules indican SNP previamente informado; La leyenda roja indica una nueva variante genética. (A) Comparación de 3'UTR de *BRCA1*. (B) Comparación de 3'UTR de *BRCA2*.

### 7.3 Equilibrio genético de las mutaciones y SNPs encontradas

El equilibrio de Hardy – Weinberg (EHW) fue determinado para cambio genético, con el propósito de determinar la independencia entre los alelos observados y los esperados. Los SNPs y variantes que se encontraban en equilibrio fueron los SNPs rs8176318 y rs12516 para el gen *BRCA1* y, rs15869 y la variante c.\*457 para *BRCA2*. En los SNPs restantes, EHW no estaba equilibrado en las muestras de los controles.

Se considera que, debido al alto flujo migratorio de la población de la región de México, tanto de otras zonas del país, como del extranjero es el motivo por el cual diversas mutaciones se encontraron desequilibradas. Se encontró una diferencia significativa entre los grupos con homocigotos con la frecuencia menor alélica (MAF) de los SNPs

rs111791349 (alelo A,  $p = 0.047$ ), rs15869 (alelo C,  $p = 0.032$ ) y c.\*457 (alelo C,  $p = 0.007$ ), que se consideraron un riesgo para los pacientes con HBOC (Tabla 7 y Anexo 3).

#### **7.4 La presencia de cambios genéticos podría modificar los mecanismos de unión de diversos miARNs**

El efecto de los cambios alélicos en las regiones 3'UTR de los genes *BRCA1* y *BRCA2* en el mecanismo de unión a miARNs fue determinado, ya que el objetivo inicial era establecer si la región de semillas miARN en las regiones 3'UTR de se mantenían y determinar la existencia de modificaciones con la unión entre miARNs-RNAm, con la eliminación de los sitios de reconocimiento o crearon nuevos loci de unión. El análisis *in silico* mostró que hay modificaciones *trans* en los mecanismos reguladores de miARN (Figura 5). Los cambios permiten diferentes miARNs, considerados como oncomiRs, es decir, hsa-miR-1248 y -4278 para *BRCA1*, o la creación de miembros del sitio de unión de la familia de miARN, como hsa-miR-548 en *BRCA2* (Tabla 6).

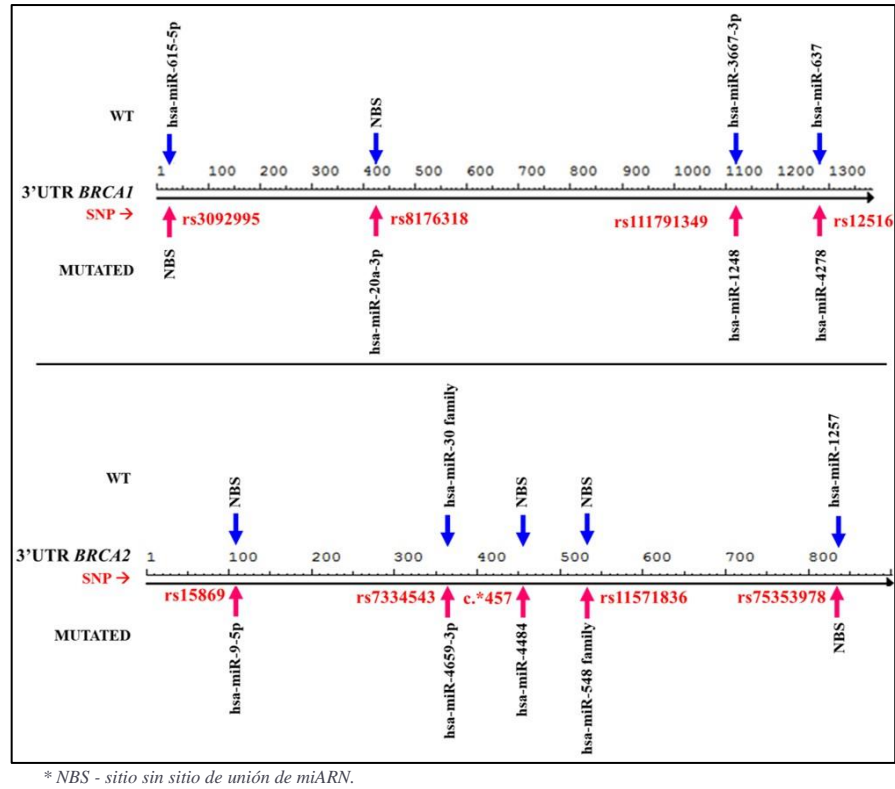
Tabla 6. Pruebas de asociación entre variantes genéticas y HBOC

Gene	Variante/ Alelos	Alelo de riesgo 1				Alelo de riesgo 2			
		Diferencia de frec. alélica	Heterocigoto	Homocigoto	Positividad alélica	Diferencia de frec. alélica	Heterocigoto	Homocigoto	Positividad alélica
		[1]↔[2]	[11] ↔ [12]	[11]↔ [22]	[11] ↔ [12+22]	[2] ↔ [1]	[22] ↔ [12]	[22] ↔ [11]	[11+12] ↔ [22]
<i>BRCA1</i>	<b>rs8176318</b>	2.4 (0.8–7.0)	1.1 (0.3–4.0)	7.5 (0.4–149.4)	1.7(0.5–5.7)	0.4 (0.1–1.3)	0.1 (0.01–3.5)	0.1 (0.01–2.7)	0.1 (0.01–2.7)
	(C/T; [1][2])	0.118 (P)	0.918	0.078	0.372	0.118 (P)	0.1185	0.078	0.079
	<b>rs12516</b>	2.2 (0.9–5.4)	0.3 (0.05–1.3)	15.4 (0.9–27.7)	1.2 (0.4–3.3)	0.5 (0.2–1.1)	0.02 (0.001–0.5)	0.1 (0.004–1.2)	0.1 (0.003–1.0)
	(C/T; [1][2])	0.082 (P)	0.078	<b>0.001</b>	0.79	0.082 (P)	<b>0.001</b>	<b>0.0099</b>	<b>0.006</b>
<i>BRCA2</i>	<b>rs15869</b>	1.5 (0.6–3.7)	0.3 (0.08–1.3)	10.7 (0.6–20.5)	0.9 (0.3–2.5)	0.7 (0.3–1.6)	0.03 (0.001–0.8)	0.1 (0.005–1.7)	0.1 (0.004–1.51)
	(A/C; [1][2])	0.366 (P)	0.097	<b>0.032</b>	0.79	0.366 (P)	<b>0.005</b>	<b>0.032</b>	<b>0.0218</b>
	<b>c.*457</b>	1.9 (0.96–3.8)	0.4 (0.1–1.2)	11.3 (1.4–22.8)	1.1 (0.5–2.5)	0.5 (0.3–1.0)	0.04 (0.004–0.4)	0.1 (0.01–0.7)	0.1 (0.01–0.6)
	(A/C; [1][2])	0.063 (P)	0.096	<b>0.007</b>	0.832	0.063 (P)	<b>0.0005</b>	<b>0.007</b>	<b>0.0021</b>

Contenido de la celda: Razón de momios (intervalo de confianza del 95%) y valor de *p*. Los valores significativos están en negrita



Variantes genéticas en la región 3'UTR de *BRCA1* y *BRCA2* y su relación en el mecanismo de microARN en cáncer de mama y ovario hereditario



**Figura 6. Mapa comparativo de miARNs unidos entre secuencias normales (WT) y mutadas.** El diagrama muestra las modificaciones trans en el mecanismo de miARNs debido a los SNPs. La flecha azul indica el sitio de unión de miARNs en WT; La flecha roja indica que los miARN se unen al sitio en mutaciones.

**Tabla 7. Efecto *in silico* de variantes alélicas en las regiones de semillas de unión a miARNs**

Gen	Variante	microARN	$\Delta\Delta G$ (Kcal/mol)	Dúplex SNP-miARN	Efecto sobre la región semilla
<i>BRCA1</i>	rs8176318 (G/T)	hsa-miR-20a-3p	Wt: 0.00	miARN: 3'-gaaaauuCACGAGU-AUUACGUCa-5'	Sitio creado
			SNP: -22.70	UTR: 5'-aaccctGTGTTCAAAATGCAGa-3'	
	rs12516 (C/T)	hsa-miR-4278	Wt: -18.30	miARN: 3'-guucccGUUUGGGGAUc-5'	Sitio creado
			SNP: -21.60	UTR: 5'-cttcccTAGCCCCCTAg-3'	
		hsa-miR-637	Wt: -28.30	miARN: 3'-ugcgucucGGGCUUUCGGGGGUCa-5'	Sitio eliminado
<i>BRCA2</i>	rs15869 (A/C)	hsa-miR-9-5p	SNP: -16.00	UTR: 5'-taggtcttCCCTAGCCCCCTAg-3'	
			Wt: -14.00	miARN: 3'-uccuugguuaucUAGCUGAUga-5'	Sitio creado
	c.*457 (A/C)	hsa-miR-4484	SNP: -23.20	UTR: 5'-ttatgttgacacATGAGCAAga-3'	
			Wt: -11.10	miARN: 3'-ACCCGAAGAGGGCGGAAAA-5'	Sitio creado
			SNP: -23.70	UTR: 5'-TGAAATAAACATACCTTTT-3'	

### **7.5 Mecanismos *trans* de miARN afectan la regulación molecular y celular**

Se realizó un análisis de ontología molecular comparativa y de señalización celular con los miARNs que crearon nuevos sitios o que fueron eliminados. En diversos estudios de otros autores, se demuestra la existencia de cambios en las rutas de señalización metabólica y génica de los controles diferenciados para cada grupo de miARNs.

En el análisis realizado en KEGG, las vías involucradas en la generación de moléculas eran características de los microambientes tumorales, como la unión de adherentes, señalización hormonal, entornos hipóxicos, etc. También se presumen cambios en las vías moleculares de estabilización y regulación del genoma en los puntos de control del ciclo y la detención celulares (hsa-miR-20a-3p, hsa-miR-4278 y hsa-miR-637).

Esto propone que la presencia de los SNPs encontrados en los pacientes con HBOC modifican las vías moleculares y celulares. Por ejemplo, los miARN hsa-miR-9-5p y hsa-miR-4484 usualmente se unen a genotipos normales regulan los mecanismos de degradación de la lisina ( $p = 0.0006$ ), señalización de HIF-1 ( $p = 0.0118$ ) y carbono central del metabolismo del cáncer ( $p = 0.0119$ ), simultáneamente. Sin embargo, por lo que se observa en los análisis *in silico* esta regulación deja de realizarse en presencia de otros miARNs. Estas diferencias aparentes de control sugieren que tanto el desarrollo temprano del tumor como la progresión del cáncer podrían ser indicativos de fenotipos agresivos de cáncer en pacientes con variantes alélicas portadoras.

## 8. DISCUSIÓN

Las pacientes reclutadas que aceptar participar en el estudio, fueron reclutadas mediante el criterio de diagnóstico de CaMa primario, entre otros específicos de las características hereditarias. Cuando se percibe un cambio en el tejido mamario, ya sea por autoexploración o valoración médica, sigue la confirmación de diagnóstico de cáncer. En el proceso de diagnóstico, se establece el tamaño, características y estadio de la enfermedad, para establecer un pronóstico y un tratamiento adecuado. Para el CaMa, se clasifican en cinco estadios van desde el 0 (*in situ* o localizada) hasta el IV, en el que se encuentra diseminado o en metástasis. Así mismo, en algunos estadios existen subcategorías dependientes del grado de tumoración, nodulación y/o presencia de metástasis (clasificación TNM).

En este estudio que más del 50% de los pacientes con HBOC fueron diagnosticados con estadio medio a tardía de la enfermedad (IIB y IIIA). La región noreste de México es una de las áreas con las tasas más altas de morbilidad y mortalidad por CaMa durante los últimos 20 años (28.58: 100,000), en comparación con las estadísticas promedio nacionales (18.97: 100,000) (INEGI 2018; Vaca-Paniagua et al. 2012).

Una parte fundamental en el diagnóstico confirmatorio de CaMa, es el estatus de los receptores de membrana que presentan las células tumorales. El grado de heterogeneidad celular determina el pronóstico y tratamiento específico. Así mismo, porque los tratamientos, cada vez están especializados hacia blancos terapéuticos moleculares específicos. Los principales blancos evaluados para CaMa son receptores de estrógeno (ER), receptor de progesterona (PR) y expresión del oncogén HER2/neu. Las pacientes con ER<sup>+</sup> y PR son aptas para tratamiento con tamoxifen, pero aquellas que no expresan receptores hormonales no pueden ser beneficiadas con esta opción. Con la introducción y aprobación de trastuzumab (herceptina), aquellos que sobreexpresaban HER2/neu son candidatos para su uso. Sin embargo, no todas las pacientes, pueden ser beneficiadas con estos tratamientos debido a la baja o nula expresión de estos tres receptores.

Existen cuatro subtipos que pueden identificarse por métodos combinados de historiología y genética. Dos de estas se derivan de tumores ER<sup>-</sup> (tipo basal y HER2<sup>+</sup>), y los otros dos se derivan de tumores ER<sup>+</sup> (luminal A y luminal B), presente sobre todo en portadores de mutaciones en el gen *BRCA1* y en mujeres afroamericanas. (Dent et al. 2007). Las pacientes que tienen un CaMa tipo basal y sin expresión de PR<sup>-</sup> y HER2neu<sup>-</sup>, son aquellas denominadas como triple negativo. Diversos estudios, mencionan que aquellos que son portadores de mutaciones en el gen *BRCA1* se encuentra relacionado con el diagnóstico de triple negativo, con respecto con aquellos que no son portadores. Siendo esta condición la de peor pronóstico, ya que no es apta para terapias convencionales.

En reportes previos, se había observado en México, entre el 23-25% eran dobles o triples negativos para los receptores ya mencionados para pacientes con HBOC (Quiyono et al., 2012; Vaca-Paniagua et al., 2012). En el muestreo de pacientes evaluados en esta tesis, se aprecia que cerca del 53% presentaban eran al menos doble negativos (36% triple negativo y 16% doble negativo), superando casi al doble de la media nacional.

Molecularmente, los miARNs relacionados con los cambios regulatorios por mutaciones de 3'UTR de *BRCA1* y *BRCA2* están relacionados en los mecanismos de desarrollo neoplásico. Estos cambios suponen un cambio en la función metabólica y celular que deben validarse mediante ensayos de luciferasa en cultivos celulares (Atchley et al. 2008; Quiyono et al. 2012; Erturk et al. 2014; S. Cao et al. 2011; J. Cao et al. 2016)

En el estudio similar anteriormente realizado en cinco colecciones de muestras se evaluó la región 3'UTR de *BRCA1*, en un ensayo de actividad de luciferasa. Se encontró que las variantes c.\*528 (G/C), c.\*718 (A/G), c.\*1271 (T/C), c.\*309 (T/C), c.\*379 (G/A), c.\*823 (C/T) y c.\*264 (C/T) disminuyeron la actividad 3'UTR en los ensayos de luciferasa, mientras que las variantes c.\*291C/T y c.\*1139G/T aumentó la actividad. Sin embargo, ninguno de estos cambios fue considerados patológicos (Brewster et al. 2012). El SNP rs3092995 (c.\*36 C/G) se informó en 1998 y los alelos CG y GG se observaron en casos de CaMa de pacientes afroamericanos (28%), con un OR ajustado por edad de 3.5 (IC 95%, 1.2-10.0); los autores determinaron que esta variante está en un desequilibrio de

vinculación parcial. En este estudio el SNP rs3092995 fue encontrado tanto en los casos de HBOC como en los controles (18% y 16%, respectivamente); según un reporte de mutaciones del noreste de México, este SNP estaba desequilibrado en la población del noreste de México (Calderón-Garcidueñas et al. 2005).

Las mutaciones encontradas en el grupo de pacientes HBOC de esta tesis son similares al análisis realizado en el subgrupo de pacientes del estudio nacional francés denominado GENESIS (GENE SYSters), en el que se evaluaron pacientes con CaMa familiar con al menos una hermana diagnosticada. En este estudio nacional detectaron los SNPs rs8176318 (G/T, MAF = 0.324) y rs12516 (C/T, MAF = 0.342) para el 3'UTR *BRCA1*, que también estaban presentes en nuestro grupo de HBOC. En los SNPs de 3'UTR-*BRCA2* rs15869 (A/C, MAF = 0.161), c.\*369 (A/G, MAF = 0.222) y rs11571836 (A/G, MAF = 0.197) fueron seleccionados como relevantes; todas estas variantes alélicas se encontraron en pacientes de etnia caucásica. Históricamente, la región noreste de México se ha caracterizado por una dinámica de población en la que muchas personas tienen antepasados en la tercera o cuarta generación de Europa o Medio Oriente; esto podría explicar la presencia de este vestigio genético como una mutación fundadora (García et al. 2016)

En esta tesis se encontró una nueva variante alélica en el 3'UTR de *BRCA2* en la posición c.\*457 (A/C), que no se ha descrito hasta ahora en ningún otro estudio similar. Esto es relevante, porque el alelo C presenta un riesgo en pacientes con HBOC ( $p = 0.007$ ). Este hallazgo es importante debido a los pocos alelos descritos para el 3'UTR de este gen.

Los SNPs rs8176318, -12516 y -15869 se encontraron y analizaron previamente en una población china, posteriormente se evaluó el papel de los SNPs en el mecanismo de miARN a través de ensayos de luciferasa en líneas celulares de MCF7 y MDA-MA-231. Rs15869 demostró una supresión de la expresión de *BRCA2*. Los autores sugieren que esta interacción aumenta el riesgo de CaMa y esto puede respaldar los resultados de esta tesis, por lo que es necesario continuar con este trabajo posteriormente, para realizar ensayos similares (Kontorovich et al. 2010; García et al. 2016)

Un factor que puede afectar el HWE de los grupos de estudio es que la región del noreste de México se ha caracterizado desde principios del siglo XX hasta la fecha por un alto asentamiento de poblaciones europeas (español, judíos asquenazíes, franceses y alemanes), Medio y Lejano Oriente (Arabia Saudita, China, Japón y Corea); más recientemente, el alto flujo de caucásicos estadounidenses, debido a la frontera con los Estados Unidos. Del mismo modo, debido a la riqueza económica de la región, existe un flujo continuo de población mestiza desde el centro y el sur de México, que es genéticamente diferente (Calderón-Garcidueñas et al. 2005). Estas razones hacen que la dinámica del flujo de genes de esta región sea alta y, por lo tanto, estos alelos están en camino de lograr el equilibrio genético. Por lo anterior, se propone que algunas variantes alélicas presentes en el grupo de HBOC analizada, pueden deberse a genes fundadores de todas las comunidades mencionadas. Debido a este fenómeno, con los SNPs ya evaluados y descritos, sería de gran relevancia establecer si las mutaciones son germinales provenientes de otras etnias o regiones de México. Asimismo, se puede considerar futuras investigaciones para rastrear en grupos de familias con antecedentes de CaMA y COv, así como cáncer de próstata.

Algunas limitaciones en esta tesis no pueden ser ignoradas ya que el tamaño de muestra relativamente pequeño reduce el poder estadístico. Esto se vio limitado con el número de individuos secuenciados, por lo que los hallazgos estadísticos no pueden extrapolarse a la población del noreste de México (aproximadamente 11.51 millones de personas). Sin embargo, los resultados obtenidos postulan datos preliminares para el estudio de variantes genéticas específicas para las regiones 3'UTR de los genes *BRCA1* y *BRCA2* en esta población, los miARNs vinculados y su implicación en la regulación fina del genoma.

Los miARN pueden desregularse por mutaciones en las regiones 3'UTR, sobre todo si estos se encuentran en las regiones semillas. Usualmente, la validación de los efectos de las variantes alélicas en sitios de unión de miARN eliminados o creados se realiza mediante ensayos de la actividad luciferasa o precipitación de Dicer en diversos tipos de líneas celulares de cáncer, por lo cual se proponen diversos análisis que puedan sustentar

estos hallazgos, aunque estas interacciones ya se encuentran documentadas en otros trabajos de investigación (Lheureux et al. 2011; J. Cao et al. 2016; Garcia et al. 2016)

## 9. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el desarrollo de la tesis permitieron concluir:

- La presencia dos variantes alélicas significativas para la región 3'UTR de *BRCA1* (rs8176318, G/T; rs12516, C/T) y de *BRCA2* (rs15869, A/C; c.\*457, A/C) que están relacionadas a un aumento en el riesgo en el grupo de pacientes diagnosticadas con HBOC.
- Una nueva variante alélicas no descrita en la región 3'UTR de *BRCA2* tanto en el grupo de HBOC, como en los controles ubicada en sitio c.\*457, con un cambio de adenina por citosina (A/C). Posiblemente, esta sea característica de la población de la región Noreste de México.
- El análisis *in silico* que los SNPs postula pérdida/creación de sitios de unión de miARN, como hsa-miR-1248 en *BRCA1* 3'UTR o el sitio de unión de la familia hsa-miR-548 en *BRCA2*. Esto proporciona pruebas de la participación de los miARN en la patogénesis del HBOC.



## 10. PERSPECTIVAS

Si bien existen limitaciones en el número de muestra (n=50) para cada grupo de estudio, los resultados encontrados en esta tesis abren el panorama de dar un primer tamizaje genético en los pacientes diagnosticados con HBOC y establece un direccionamiento hacia nuevos hallazgos.

Las predicciones moleculares realizadas *in silico* deben evaluarse mediante un ensayo de actividad de luciferasa o ensayos similares para demostrar el profundo impacto de las variaciones alélicas encontradas en la regulación molecular. Esto solo con la finalidad de cotejar investigaciones similares para los SNPs rs8176318, rs12516 y rs15869 que ya han sido descritos. Para la nueva mutación si es sumamente necesario realizar estos futuros ensayos.

Las investigaciones futuras deben inclinarse en la evaluación del mecanismo de unión de miARN para desarrollar herramientas de diagnóstico, pronóstico y tratamiento basadas en la tecnología de miARN. Es por lo anterior que se considera este trabajo de tesis como una investigación pionera y piloto en la comprensión de HBOC en una población mestiza mexicana.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

1. Frank TS. Hereditary cancer syndromes. Arch Pathol Lab Med [Internet]. 2001 Jan;125(1):85–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17935271>
2. Fearon ER. Human Cancer Syndromes: Clues to the Origin and Nature of Cancer. Science (80- ) [Internet]. 1997 Nov 7 [cited 2016 Feb 29];278(5340):1043–50. Available from: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.278.5340.1043>
3. Shulman LP. Hereditary Breast and Ovarian Cancer (HBOC): Clinical Features and Counseling for BRCA1 and BRCA2, Lynch Syndrome, Cowden Syndrome, and Li-Fraumeni Syndrome. Vol. 37, Obstetrics and Gynecology Clinics of North America. 2010. p. 109–33.
4. Bustreo F, Chestnov O. WHO | A month to remember – Breast Cancer Awareness Month [Internet]. WHO. World Health Organization; 2015 [cited 2016 Mar 14]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/commentaries/breast-cancer-awareness/en/>
5. INEGI IN de E y G. Estadísticas a propósito del... Día Mundial contra el Cáncer (4 de febrero). Datos nacionales [Internet]. Aguascalientes, Ags; 2016 [cited 2016 Mar 14]. Available from: [http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2016/cancer2016\\_0.pdf](http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2016/cancer2016_0.pdf)
6. Lynch HT, Lynch JF, Lynch PM, Attard T. Hereditary colorectal cancer syndromes: molecular genetics, genetic counseling, diagnosis and management. Fam Cancer [Internet]. 2008 Mar 13;7(1):27–39. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10689-007-9165-5>
7. Vaca-Paniagua F, Alvarez-Gomez RM, Fragoso-Ontiveros V, Vidal-Millan S, Herrera LA, Cantú D, et al. Full-exon pyrosequencing screening of BRCA germline mutations in Mexican women with inherited breast and ovarian cancer. PLoS One [Internet]. 2012 Jan [cited 2013 Dec 23];7(5):e37432. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3360054&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

8. Gronwald J, Byrski T, Huzarski T, Oszurek O, Janicka A, Szymanska-Pasternak J, et al. Hereditary breast and ovarian cancer. *Hered Cancer Clin Pract* [Internet]. 2008 [cited 2016 Mar 14];6(2):88–98. Available from: <http://www.hccpjjournal.com/content/6/2/88>
9. Pruthi S, Gostout BS, Lindor NM. Identification and Management of Women With BRCA Mutations or Hereditary Predisposition for Breast and Ovarian Cancer. *Mayo Clin Proc* [Internet]. 2010 Dec [cited 2016 Mar 14];85(12):1111–20. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0025619611603650>
10. Jatoi I, Anderson WF. Management of Women Who Have a Genetic Predisposition for Breast Cancer. *Surg Clin North Am* [Internet]. 2008 Aug [cited 2016 Mar 14];88(4):845–61. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039610908000480>
11. Petrucelli N, Daly MB, Pal T. BRCA1- and BRCA2-Associated Hereditary Breast and Ovarian Cancer [Internet]. *GeneReviews*(®). University of Washington, Seattle; 1993 [cited 2016 Mar 14]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20301425>
12. Quiyono MO, Colín SC, Gorráez De La Mora MT, Del M, Chima Galán C, Lladó DS. Características epidemiológicas del cáncer de mama y ovario hereditario y del cáncer de mama esporádico en una muestra de la población del ISSSTE. *Rev Esp Méd Quir Vol*. 2012;17(4).
13. McLaughlin JR, Risch HA, Lubinski J, Moller P, Ghadirian P, Lynch H, et al. Reproductive risk factors for ovarian cancer in carriers of BRCA1 or BRCA2 mutations: a case-control study. *Lancet Oncol* [Internet]. 2007 Jan;8(1):26–34. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1470204506709834>
14. Bash E. *Cancer Epidemiology* [Internet]. Verma M, editor. Totowa, NJ: Humana Press; 2009. (Methods in Molecular Biology; vol. 471). Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-59745-416-2>
15. Ding YC, McGuffog L, Healey S, Friedman E, Laitman Y, Paluch-Shimon S-, et al. A Nonsynonymous Polymorphism in IRS1 Modifies Risk of Developing Breast and Ovarian Cancers in BRCA1 and Ovarian Cancer in BRCA2 Mutation Carriers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* [Internet]. 2012 Aug 1 [cited 2016 Mar

- 14];21(8):1362–70. Available from:  
<http://cebp.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1055-9965.EPI-12-0229>
16. Rakha EA, Reis-Filho JS, Ellis IO. Basal-Like Breast Cancer: A Critical Review. *J Clin Oncol* [Internet]. 2008 May 20;26(15):2568–81. Available from:  
<http://jco.ascopubs.org/cgi/doi/10.1200/JCO.2007.13.1748>
17. Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, Hanna WM, Kahn HK, Sawka CA, et al. Triple-Negative Breast Cancer: Clinical Features and Patterns of Recurrence. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2007 Aug 1 [cited 2016 Mar 14];13(15):4429–34. Available from:  
<http://clincancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1078-0432.CCR-06-3045>
18. Atchley DP, Albarracin CT, Lopez A, Valero V, Amos CI, Gonzalez-Angulo AM, et al. Clinical and Pathologic Characteristics of Patients With BRCA-Positive and BRCA-Negative Breast Cancer. *J Clin Oncol* [Internet]. 2008 Sep 10 [cited 2016 Mar 14];26(26):4282–8. Available from:  
<http://jco.ascopubs.org/cgi/doi/10.1200/JCO.2008.16.6231>
19. Antoniou A, Pharoah PDP, Narod S, Risch HA, Eyfjord JE, Hopper JL, et al. Average Risks of Breast and Ovarian Cancer Associated with BRCA1 or BRCA2 Mutations Detected in Case Series Unselected for Family History: A Combined Analysis of 22 Studies. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2003 May [cited 2016 Mar 15];72(5):1117–30. Available from:  
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002929707606405>
20. Andrieu N, Goldgar DE, Easton DF, Rookus M, Brohet R, Antoniou AC, et al. Pregnancies, Breast-Feeding, and Breast Cancer Risk in the International BRCA1/2 Carrier Cohort Study (IBCCS). *JNCI J Natl Cancer Inst* [Internet]. 2006 Apr 19 [cited 2016 Mar 14];98(8):535–44. Available from:  
<http://jnci.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/jnci/djj132>
21. Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* [Internet]. 1994 Oct 7 [cited 2016 May 10];266(5182):66–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7545954>
22. Tavtigian S V, Simard J, Rommens J, Couch F, Shattuck-Eidens D, Neuhausen S, et al. The complete BRCA2 gene and mutations in chromosome 13q-linked

- kindreds. *Nat Genet* [Internet]. 1996 Mar [cited 2016 May 10];12(3):333–7. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ng0396-333>
23. Friedenson B. The BRCA1/2 pathway prevents hematologic cancers in addition to breast and ovarian cancers. *BMC Cancer* [Internet]. 2007 [cited 2016 May 9];7(7). Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2407/7/152>
24. Frank SA. Somatic mutation: early cancer steps depend on tissue architecture. *Curr Biol* [Internet]. 2003 Apr 1 [cited 2016 May 10];13(7):R261-3. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960982203001957>
25. Wang Y, Cortez D, Yazdi P, Neff N, Elledge SJ, Qin J. BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. *Genes Dev* [Internet]. 2000 Apr 15 [cited 2016 May 10];14(8):927–39. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10783165>
26. Starita LM, Parvin JD. The multiple nuclear functions of BRCA1: transcription, ubiquitination and DNA repair. *Curr Opin Cell Biol* [Internet]. 2003 Jun [cited 2016 May 10];15(3):345–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12787778>
27. Paull TT, Cortez D, Bowers B, Elledge SJ, Gellert M. Direct DNA binding by Brca1. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2001 May 22 [cited 2016 May 10];98(11):6086–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11353843>
28. Durant ST, Nickoloff JA. Good timing in the cell cycle for precise DNA repair by BRCA1. *Cell Cycle* [Internet]. 2005 Sep 22 [cited 2016 May 10];4(9):1216–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16103751>
29. Xia B, Sheng Q, Nakanishi K, Ohashi A, Wu J, Christ N, et al. Control of BRCA2 cellular and clinical functions by a nuclear partner, PALB2. *Mol Cell* [Internet]. 2006 Jun 23 [cited 2016 May 11];22(6):719–29. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16793542>
30. Yang H, Jeffrey PD, Miller J, Kinnucan E, Sun Y, Thoma NH, et al. BRCA2 function in DNA binding and recombination from a BRCA2-DSS1-ssDNA structure. *Science* [Internet]. 2002 Sep 13 [cited 2016 May 11];297(5588):1837–48. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12228710>

31. Díez Gilbert O. Estudio molecular de los genes *BRCA1* y *BRCA2* en cáncer de mama hereditario. *Educ Contin en el Lab Clínico*. 2006;9:19–27.
32. Bowtell DDL. The genesis and evolution of high-grade serous ovarian cancer. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2010 Nov [cited 2016 May 11];10(11):803–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20944665>
33. Wilson CA, Ramos L, Villaseñor MR, Anders KH, Press MF, Clarke K, et al. Localization of human *BRCA1* and its loss in high-grade, non-inherited breast carcinomas. *Nat Genet* [Internet]. 1999 Feb [cited 2016 May 11];21(2):236–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9988281>
34. Jacinto F V, Esteller M. Mutator pathways unleashed by epigenetic silencing in human cancer. *Mutagenesis* [Internet]. 2007 Jul 1 [cited 2016 May 11];22(4):247–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17412712>
35. Reuter TY, Medhurst AL, Waisfisz Q, Zhi Y, Herterich S, Hoehn H, et al. Yeast two-hybrid screens imply involvement of Fanconi anemia proteins in transcription regulation, cell signaling, oxidative metabolism, and cellular transport. *Exp Cell Res* [Internet]. 2003 Oct 1 [cited 2016 May 11];289(2):211–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14499622>
36. Levin B, Lech D, Friedenson B. Evidence that *BRCA1*- or *BRCA2*-associated cancers are not inevitable. *Mol Med* [Internet]. 2012 [cited 2016 May 11];18:1327–37. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22972572>
37. Moskwa P, Buffa FM, Pan Y, Panchakshari R, Gottipati P, Muschel RJ, et al. miR-182-mediated downregulation of *BRCA1* impacts DNA repair and sensitivity to PARP inhibitors. *Mol Cell* [Internet]. 2011 Jan 21 [cited 2016 May 11];41(2):210–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21195000>
38. Garcia AI, Buisson M, Bertrand P, Rimokh R, Rouleau E, Lopez BS, et al. Down-regulation of *BRCA1* expression by miR-146a and miR-146b-5p in triple negative sporadic breast cancers. *EMBO Mol Med* [Internet]. 2011 May [cited 2016 May 11];3(5):279–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21472990>
39. Sun C, Li N, Yang Z, Zhou B, He Y, Weng D, et al. miR-9 regulation of *BRCA1* and ovarian cancer sensitivity to cisplatin and PARP inhibition. *J Natl Cancer Inst* [Internet]. 2013 Nov 20 [cited 2016 May 11];105(22):1750–8. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24168967>

40. Valdespino-Gómez VM, Valdespino-Castillo VE. Utilidad de la consulta oncogenética molecular en individuos adultos con cáncer familiar. Useful oncogenetic Mol Couns adults whith Fam cancer. 2016;
41. Vidal-Millán S. Cáncer de Mama Hereditario: Identificación y elección de pacientes para estudio molecular de los genes BRCA. Cancerología. 2008;
42. Weitzel JN, Clague J, Martir-Negron A, Ogaz R, Herzog J, Ricker C, et al. Prevalence and type of BRCA mutations in Hispanics undergoing genetic cancer risk assessment in the southwestern United States: A report from the clinical cancer genetics community research network. J Clin Oncol. 2013;
43. Alemar B, Herzog J, Brinckmann Oliveira Netto C, Artigalás O, Schwartz IVD, Matzenbacher Bittar C, et al. Prevalence of Hispanic BRCA1 and BRCA2 mutations among hereditary breast and ovarian cancer patients from Brazil reveals differences among Latin American populations. Cancer Genet. 2016;
44. Schubert EL, Lee MK, Mefford HC, Argonza RH, Morrow JE, Hull J, et al. BRCA2 in American families with four or more cases of breast or ovarian cancer: recurrent and novel mutations, variable expression, penetrance, and the possibility of families whose cancer is not attributable to BRCA1 or BRCA2. Am J Hum Genet [Internet]. 1997 May;60(5):1031–40. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1712449&tool=pmc.ncbi&rendertype=abstract>
45. Anonymous. 5th International Symposium on Hereditary Breast and Ovarian Cancer, BRCA: Twenty Years of Advances. Curr Oncol. 2014;
46. Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. Cell [Internet]. 1993 Dec 3 [cited 2016 May 11];75(5):855–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8252622>
47. Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. Genome Res [Internet]. 2009 Jan [cited 2012 Mar 11];19(1):92–105. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2612969&tool=pmc.ncbi&rendertype=abstract>

ntrez&rendertype=abstract

48. Zeng Y. Principles of micro-RNA production and maturation. *Oncogene*. 2006;25(46):6156–62.
49. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*. 2005;120(1):15–20.
50. He L, Thomson JM, Hemann MT, Hernando-Monge E, Mu D, Goodson S, et al. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature* [Internet]. 2005;435(7043):828–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15944707>
51. Kusenda B, Mraz M, Mayer J, Pospisilova S. MicroRNA biogenesis, functionality and cancer relevance. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacký, Olomouc, Czechoslov* [Internet]. 2006 Nov;150(2):205–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17426780>
52. Sethupathy P, Collins FS. MicroRNA target site polymorphisms and human disease. *Trends Genet* [Internet]. 2008 Oct [cited 2014 Aug 8];24(10):489–97. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18778868>
53. Clop A, Marcq F, Takeda H, Pirottin D, Tordoir X, Bibé B, et al. A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep. *Nat Genet* [Internet]. 2006 Jul 4 [cited 2014 Jul 23];38(7):813–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16751773>
54. Pontillo A, Brandão LA, Guimarães RL, Segat L, Athanasakis E, Crovella S. A 3'UTR SNP in NLRP3 gene is associated with susceptibility to HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* [Internet]. 2010 Jul [cited 2014 Aug 12];54(3):236–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20502346>
55. Pelletier C, Speed WC, Paranjape T, Keane K, Blitzblau R, Hollestelle A, et al. Rare BRCA1 haplotypes including 3'UTR SNPs associated with breast cancer risk. *Cell Cycle* [Internet]. 2011 Jan 1 [cited 2014 Aug 12];10(1):90–9. Available from: <http://www.landesbioscience.com/journals/cc/article/14359/>
56. Erturk E, Cecener G, Polatkan V, Gokgoz S, Egeli U, Tunca B, et al. Evaluation of genetic variations in miRNA-binding sites of BRCA1 and BRCA2 genes as risk



- factors for the development of early-onset and/or familial breast cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* [Internet]. 2014;15(19):8319–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25339023>
57. Cao S, Kumimoto RW, Siriwardana CL, Risinger JR, Holt BF. Identification and characterization of NF-Y transcription factor families in the monocot model plant *Brachypodium distachyon*. *PLoS One* [Internet]. 2011 Jan [cited 2014 Feb 7];6(6):e21805. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3128097&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
58. Cao J, Luo C, Yan R, Peng R, Wang K, Wang P, et al. rs15869 at miRNA binding site in *BRCA2* is associated with breast cancer susceptibility. *Med Oncol*. 2016;
59. Brewster BL, Rossiello F, French JD, Edwards SL, Wong M, Wronski A, et al. Identification of fifteen novel germline variants in the *BRCA1* 3'UTR reveals a variant in a breast cancer case that introduces a functional miR-103 target site. *Hum Mutat*. 2012;
60. Calderón-Garcidueñas AL, Ruiz-Flores P, Cerda-Flores RM, Barrera-Saldaña HA. Clinical follow up of Mexican women with early onset of breast cancer and mutations in the *BRCA1* and *BRCA2* genes. *Salud Publica Mex*. 2005;
61. Garcia AI, Buisson M, Damiola F, Tessereau C, Barjhoux L, Verny-Pierre C, et al. Mutation screening of *MIR146A/B* and *BRCA1/2* 3'-UTRs in the GENESIS study. *Eur J Hum Genet*. 2016;
62. Kontorovich T, Levy A, Korostishevsky M, Nir U, Friedman E. Single nucleotide polymorphisms in miRNA binding sites and miRNA genes as breast/ovarian cancer risk modifiers in Jewish high-risk women. *Int J Cancer* [Internet]. 2010 Feb 15;127(3):589–97. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=pubmed&cmd=Retrieve&dopt=AbstractPlus&list\\_uids=19950226](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=pubmed&cmd=Retrieve&dopt=AbstractPlus&list_uids=19950226)
63. Lheureux S, Lambert B, Krieger S, Legros A, Vaur D, Denoyelle C, et al. Two novel variants in the 3'UTR of the *BRCA1* gene in familial breast and/or ovarian cancer. *Breast Cancer Res Treat* [Internet]. 2011 Feb [cited 2014 Aug 12];125(3):885–91. Available from:

Variantes genéticas en la región 3'UTR de *BRCA1* y *BRCA2* y su relación en el mecanismo de microARN en cáncer de mama y ovario hereditario

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20848184>

## **RESUMEN BIOGRÁFICO**

María Marisela Sánchez Chaparro

Candidato para el Grado de

Doctor en Ciencias con Orientación en Inmunobiología

Tesis: VARIANTES GENÉTICAS EN LA REGIÓN 3'UTR DE LOS GENES *BRCA1* Y *BRCA2* Y SU POTENCIAL EFECTO EN EL MECANISMO DE microRNA EN CÁNCER DE MAMA Y OVARIO HEREDITARIO

Campo de Estudio: Ciencias de Biomédicas

Datos personales: Nacida en San Pedro de las Colonias, Coahuila, el 25 de Julio de 1986, hija de José Concepción Sánchez Carrillo (†) y María de Jesús Chaparro Rodríguez.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Coahuila, como Ingeniero Bioquímico en 2009, con mención honorífica, y como Maestra en Investigación Multidisciplinaria de Salud en 2012.

Experiencia profesional: Profesora de Cátedra del Instituto Tecnológico de Estudios Superiores de Monterrey, Campus Laguna (2012-2014); Facultad de Ciencias Biológicas, UAdeC (2013-2014); Facultad de Ciencias Biológicas, UANL (2018) y en la Universidad del Valle de México (2019). Profesor Asociado “B” del Centro de Bachillerato Tecnológico industrial y de servicios No. 99 “Venustiano Carranza Garza”.



Article

## Genetic Variants in the 3'UTR of *BRCA1* and *BRCA2* Genes and Their Putative Effects on the microRNA Mechanism in Hereditary Breast and Ovarian Cancer

María Marisela Sánchez-Chaparro <sup>1,†</sup>, Idalia Garza-Veloz <sup>2,†</sup> , Omar Alejandro Zayas-Villanueva <sup>3,†</sup>, Margarita L. Martínez-Fierro <sup>2,\*</sup> , Iván Delgado-Enciso <sup>4,5</sup>, Mayra Alejandra Gomez-Govea <sup>6</sup>, Laura Elia Martínez-de-Villarreal <sup>7</sup>, Diana Reséndez-Pérez <sup>1</sup> and Iram Pablo Rodríguez-Sánchez <sup>6,\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Immunology and Virology, Collage of Biological Sciences, Universidad Autónoma de Nuevo Leon, San Nicolas de los Garza, Nuevo Leon 66451, Mexico; marisela.sanchezchp@uanl.edu.mx (M.M.S.-C.); diarendez@gmail.com (D.R.-P.)

<sup>2</sup> Molecular Medicine Laboratory, Human Medicine and HS Academic Unit, Universidad Autonoma de Zacatecas, Zacatecas, Zacatecas 98160, Mexico; idaliagv@uaz.edu.mx

<sup>3</sup> University Center Against Cancer (CUCC), Hospital Universitario "Dr. José E. González", Collage of Medicine, Universidad Autónoma de Nuevo Leon, Monterrey, Nuevo Leon 64460, Mexico; oa.zayas@gmail.com

<sup>4</sup> Faculty of Medicine, Universidad de Colima, Colima, Colima 28040, Mexico; ivan\_delgado\_enciso@uacol.mx

<sup>5</sup> Colima State Cancer Institute, Universidad de Colima, Colima, Colima 28040, Mexico

<sup>6</sup> Laboratory of Molecular and Structural Physiology, Collage of Biological Sciences, Universidad Autonoma de Nuevo Leon, San Nicolas de los Garza, Nuevo Leon 66451, Mexico; mayragee@gmail.com

<sup>7</sup> Department of Genetics, Collage of Medicina, Universidad Autonoma de Nuevo Leon, Monterrey, Nuevo Leon 64460, Mexico; laelmar@yahoo.com.mx

\* Correspondence: margaritamf@uaz.edu.mx (M.L.M.-F.); iramrodriguez@gmail.com (I.P.R.-S.); Tel.: +52-492-925-6690 (M.L.M.-F.); +52-818-329-4217 (I.P.R.-S.)

† These authors contributed equally to this work.

Received: 26 February 2020; Accepted: 10 April 2020; Published: 13 May 2020



**Abstract:** Hereditary breast and ovarian cancer (HBOC) syndrome is mainly caused by mutations in the *BRCA1* and *BRCA2* genes. The 3'UTR region allows for the binding of microRNAs, which are involved in genetic tune regulation. We aimed to identify allelic variants on 3'UTR miRNA-binding sites in the *BRCA1* and *BRCA2* genes in HBOC patients. Blood samples were obtained from 50 patients with HBOC and from 50 controls. The 3'UTR regions of *BRCA1* and *BRCA2* were amplified by PCR and sequenced to identify genetic variants using bioinformatics tools. We detected nine polymorphisms in 3'UTR, namely: four in *BRCA1* (rs3092995 (C/G), rs8176318 (C/T), rs111791349 (G/A), and rs12516 (C/T)) and five in *BRCA2* (rs15869 (A/C), rs7334543 (A/G), rs1157836 (A/G), and rs75353978 (TT/del TT)). A new variant in position c.\*457 (A/C) on 3'UTR of *BRCA2* was also identified. The following three variants increased the risk of HBOC in the study population: rs111791349-A, rs15869-C, and c.\*457-C (odds ratio (OR) range 3.7–15.4;  $p < 0.05$ ). Genetic variants into the 3'UTR of *BRCA1* and *BRCA2* increased the risk of HBOC between 3.7–15.4 times in the study population. The presence/absence of these polymorphisms may influence the loss/creation of miRNA binding sites, such as hsa-miR-1248 in *BRCA1* 3'UTR or the hsa-miR-548 family binding site in *BRCA2*. Our results add new evidence of miRNA participation in the pathogenesis of HBOC.

**Keywords:** hereditary breast and ovarian cancer; *BRCA1*; *BRCA2*; miRNA; polymorphism; 3'UTR region

## 1. Introduction

Breast and ovarian cancer are the most common types of cancer among women, and account for 16% of all cancers in women globally; a total of 1.38 million new cases per year are estimated worldwide [1]. Hereditary cancer syndromes are disorders characterized by an above-average increase in the risk of cancer-specific tissue development [2]. Neoplasms develop because of germ line mutations in specific genes. Among these types of cancer are Li-Fraumeni syndrome, hereditary gastric cancer, von Hippel-Lindau, and hereditary breast and ovary cancer (HBOC) syndromes [2–4]. HBOC syndrome is an autosomal dominant disease of incomplete penetrance, with the appearance of neoplasms in the breast and ovary before 40 years of age and is an aggressive form of cancer. Germline mutations in the *BRCA1* and *BRCA2* genes are primarily responsible for HBOC [3,5].

*BRCA1* and *BRCA2* are tumor suppressor genes, and are involved in the mechanisms of double-stranded DNA error repair. In addition to RAD51, p53 is involved in the stability and safety of the genome at cell cycle checkpoints; those that are not repaired send signals of regulated cell death, such as apoptosis and cell arrest. However, errors in the functions of the proteins encoded by these genes provoke cell proliferation [5]. There are regulatory events that reduce the function of *BRCA1* and *BRCA2*, such as promoter hypermethylation and posttranslational regulation by microRNAs (miRNAs) [6,7].

MicroRNAs (miRNAs) are endogenous noncoding RNA molecules of 17–24 nt, capable of fine-tuning transcription of about 50% of genome organisms. They are a type of interfering RNA (iRNA); their target of action is in the 3'UTR regions ( $\approx 90\%$ ), but they have been found to be able to regulate in sequences located in 5'UTR and in open read frame (ORF) regions (Sun 2013). Sequences of miRNAs, as well as their targets, are highly conserved in species, mainly 7–8 nt in the 5' sense, called the “seed region”. miRNAs can degrade mRNA completely (perfect complementation in binding site) or repress translation (partial complementation). Because of the high degree of conservation of seed regions and white sites, it has been observed that mutations or single nucleotide polymorphisms (SNPs) at the miRNA binding sites are mechanisms of natural selection of organisms [8]. This mechanism can be observed when SNPs in the 3'UTR regions of various genes are involved in the development of degenerative diseases, such as Tourette's syndrome, diabetes, cancer in humans, and muscular dystrophies in different vertebrates [9,10].

The northeast region of Mexico is a particular area where the population has a high rate of miscegenation, because of the high migratory flow between mestizo ancestry (characteristics of central and southern Mexico) and a high genetic mixture among the American and European populations (mainly Spanish, Ashkenazi Jews, French, and Germans) [11]. SNPs have been identified in 3'UTR *BRCA1* and *BRCA2* gene regions in specific populations. These allelic variants are associated with the increased risk of developing breast or ovary cancer, mainly in those related to HBOC [12–15]. In addition, SNPs represent a form of trans-regulation of miRNAs that change the mRNA affinity because of the creation or elimination of binding sites, which could result in highly inheritable mutations that produce the phenotypes associated with the development of HBOC. We performed an exploratory study in a Mexican population in order to evaluate allelic variations in the 3'UTR regions of the *BRCA1* and *BRCA2* genes, and to determine if their presence allows for the onset and/or elimination of miRNA binding sites, and whether the mutations are associated with HBOC syndrome.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Study Population

A case-control study was performed. Electronic records of patients previously treated at the University Cancer Center of the University of Nuevo Leon were selected based on specific inclusion criteria (women with clinical data of HBOC: diagnosis of primary breast cancer,  $\leq 45$  years of age at the time of diagnosis, and familiar history of breast or ovarian cancer in  $\geq 3$  relatives). After selection, the patients were contacted. Clinically healthy women with a risk estimation  $< 1\%$  using the Gail

calculation tool,  $\leq 45$  years of age, were included as controls. The women who agreed to participate in the study were interviewed for updating the clinical record and signed consent. Individuals belonged to the Northeastern region of Mexico, including ancestry in the first and second degree. The protocol was submitted and approved by the Ethics Committee of the College of Medicine of the Universidad Autonoma de Nuevo Leon (ID: G15-003).

## 2.2. Amplification of 3'UTRs *BRCA1* and *BRCA2* Regions

DNA was isolated and purified from peripheral blood using the commercial kit DNA Isolation, Serum and Plasma (Qiagen, Frederick, MD, USA), following the manufacturer's specifications. The quality of the samples was verified using a spectrophotometer (Nanodrop, Thermo Scientific™, Waltham, MA, USA). The genomic material was concentrated to 50 ng/ $\mu$ L, eluted to a final volume of 100  $\mu$ L, and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until PCR amplification. The primers were designed for the specific 3'UTR of each gene of interest, using the sequences provided by GenBank for *BRCA1* (NM\_007294.3) and *BRCA2* (NM\_000059.3), and Primer Blast software was used to obtain an amplified product (AP) of 1420 bp for *BRCA1* (forward: ACCTGATACCCAGATCCCC; reverse: TTTGGAAGTGTGCTACCAGG) and 902 bp *BRCA2* (forward: GAACAGGAGAGTTCAGG; reverse: AATCAGTGCCAATTGAAAGCA). A PCR reaction was performed using JumpStart Taq ReadyMix™ (Sigma-Aldrich™, St. Louis, MO, USA). The reactions had a final volume of 30  $\mu$ L, 10  $\mu$ M of which was used for each primer, and 1  $\mu$ L was for the DNA template (50 ng/ $\mu$ L). The final volume was completed with nuclease-free water. The amplification program consisted of one cycle of  $94^{\circ}\text{C} \times 4$  min, followed by 35 amplification cycles (denaturation at  $94^{\circ}\text{C} \times 1$  min; alignment at  $60^{\circ}\text{C} \times 30$  s; and extension at  $72^{\circ}\text{C} \times 1$  min), and a final extension cycle of  $72^{\circ}\text{C} \times 6$  min. To clean the AP, we added 2 mL of ExoSAP-IT.® Product Cleanup (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) to 5  $\mu$ L of AP, and incubated at  $37^{\circ}\text{C} \times 15$  min and then  $80^{\circ}\text{C} \times 15$  min to inactivate the reagent. Because of the lack of DNA samples from individuals, these procedures could not be analyzed in duplicate in all cases.

## 2.3. Sequencing and Analysis of 3'UTR Regions

The 3'UTRs region labelling was performed using the BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing commercial kit (Applied Biosystem, Foster, CA, USA). Because the resolution of the capillary is approximately 500 bp, we designed internal primers to amplify short fragments (350–550 bp) for a better reading accuracy (Table 1).

**Table 1.** Internal primers used for labelling sequences. Primer used in to perform 3'UTR (*BRCA1* and *BRCA2*) sequencing.

Gene	Primer Sequences 5'→3'	Tm ( $^{\circ}\text{C}$ )
<i>BRCA1</i>	ACCTGATACCCAGATCCCC	60.0
	ATCCAAGCACTCTCCTTCC	57.3
	CCTGTGTTTCAAAAGGCAGA	62.0
	TGATCTTGGCTCACTGCAAC	57.3
	GGCAGGAGAATCACTCAGC	57.9
	GCAACAGCTTCCTTCTGGTGGG	56.1
	GGAAAATGAAACTAGAAGAGATT	58.0
	AGGCTCTGAGAAAGTCGGCT	60.0
<i>BRCA2</i>	GAACAGGAGAGTTCCAGGC	56.0
	CCCACCTCAGCTTCTCAAAG	57.3
	GGTGGCTCATGCCTGTAATC	57.9
	TTGCTCAAAGGAAACACCA	56.1
	CAGTTATTGATGCAGATTCC	58.0
	AATCAGTGCCAATTGAAAGCA	60.0



The sequencing reaction, with 1 µL of BigDye, 2 µL of 10× buffer, 1 µL of oligonucleotide (30 ng/µL), 3.5 µL of AP, and milliQ water, was prepared to a final volume of 10 µL. The labelling program consisted of one cycle of 96 °C × 1 min, and 25 cycles of 96 °C × 10 s, 50 °C × 5 s, and 60 °C × 4 min. The resulting products were purified, stored, and protected from light at −20 °C. We used the ABI-3130xl sequencer Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems), a 36-cm capillary (Applied Biosystem) and the POP-4 polymer, following the manufacturer's instructions. After sequencing, the files that contained electropherograms were analyzed using the GeneStudio™ Professional software v20.

The sequences obtained after testing were stored in FASTA format for further analysis. The sequencing results were compared with the wild type sequences of the *BRCA1* and *BRCA2* genes. The relationship between the known variants and the risk of HBOC were verified using the online bioinformatic and supports programs Ensemble Genome Browser (ENSEMBL; <http://www.ensembl.org/>), the Human Gene Mutation Database (HGMD; <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/all.php>), and Human Genome Variations Society (HGVS; <http://www.hgvs.org/dblist/dblist.html>). We also used the NCBI database of SNPs (dbSNP) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>) to obtain information about genetic variations.

#### 2.4. Clinical and Statistical Analysis

Simple frequency calculations of the HBOC risk variables and the clinical characteristics of the study participants were determined by direct counts, and it were expressed as percentages and means ± standard deviation. An evaluation of the possible relationship between genotypes/alleles and HBOC was done using the SNPstat program (<https://www.snpstats.net/start.htm>) from the Institute of Oncology of Catalonia (Catalonia, Spain) [15]. Odds ratios (ORs) were estimated for each genotype variant. The Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) was analyzed using online software. In the case control studies, tests for deviation from the Hardy–Weinberg equilibrium, and tests for association, (<https://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>; Neuherberg, Germany) *p*-values < 0.05 were considered significant.

### 3. Results

#### 3.1. HBOC Population

A total of 50 patients were clinically characterized with HBOC and, therefore, they were included in the study; the mean age at the first diagnosis of breast cancer was 37.28 years (range 25–45 years). Of these patients, 34% had a status at least double or triple negative (TNC) at estrogen (ER), progesterone (PR), and human epidermal growth factor receptor 2 (HER2/neu) receptors ((ER–PR–HER2+ *n* = 3; ER+ PR–HER2– *n* = 8; TNC *n* = 17). The clinical relevance of the carriers of mutations in 3'UTR *BRCA1* and *BRCA2* are shown in Table 2.

The purpose of our study similar to that proposed by Erturk et al. (2014) [12], who carried out an exploratory study on the genetic situation of the population, and will require future case-control trials with a larger number of samples. We identified nine SNPs in the 3'UTR region of *BRCA1* and *BRCA2* genes. These variants were rs3092995 (C/G), rs8176318 (C/T), rs111791349 (G/A), and rs12516 (C/T) for 3'UTR *BRCA1*. For *BRCA2*, we identified the polymorphisms rs15869 (A/C); rs7334543 (A/G); rs1157836 (A/G); rs75353978 (TT/del TT); and a new variant, not identified yet, in position c.\*457 (A/C) (Figure 1). The genotypic and allelic frequency percentages are shown in Table 3.

**Table 2.** Clinical description of the study population. Clinical aspects of hereditary breast and ovarian cancer (HBOC) participants.

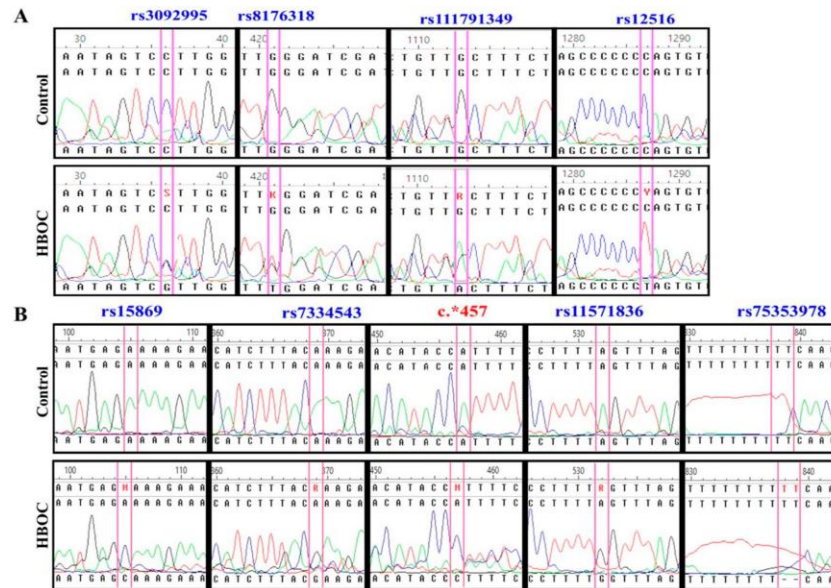
Clinical Data	>%	Clinical Data	%
<b>Diagnostic age (years)</b>	Mean 37.28 ± 3.30	<b>Receptor status (ER, PR, HER2/neu)</b>	
<b>BMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>	Mean 27.76 ± 5.59	ER <sup>+</sup> PR <sup>+</sup> HER2 <sup>+</sup>	10%
<b>Disease free-survival</b>		ER <sup>+</sup> PR <sup>+</sup>	40%
>36 months	29%	ER <sup>+</sup> HER2 <sup>+</sup>	2%
<36 months No data	21% 50%	HER2 <sup>+</sup>	6%
<b>Menarche</b>	11.77 ± 2.48	ER <sup>+</sup>	4%
<b>Menopause</b>		Triple negative	34%
Yes	38%	<b>Therapy</b>	
No	62%	Chemotherapy	
<b>Oral-contraceptive use</b>		AC(4)-Taxol(12)	28%
Yes (>5 years)	74%	Anthracyclines	18%
No	20%	Taxanes	10%
<b>Inclusion criteria</b>		Capecitabine	2%
Family history	41%	Not specified	10%
Diagnostic >40 years	59%	No chemotherapy	32%
<b>Births</b>		Radiotherapy	
0	20%	Adjuvant	76%
1,2	54%	Palliative	2%
3–5	20%	Adjuvant/Palliative	2%
>5	3%	No radiotherapy	16%
<b>Screening method</b>		Hormone therapy	
Autoexploration	88%	Yes (Tamoxifen)	54%
Clinical finding	2%	No hormone therapy	42%
Mastography	4%	<b>TNM Score</b>	
<b>Smoke</b>		I A	4%
Yes	78%	I B	10%
No	22%	II A	16%
<b>Histology</b>		II B	20%
Infiltrating ductal	74%	III A	34%
Medullar carcinoma	4%	III B	4%
Lobular	2%	III C	4%
Ductal/Lobular	2%	IV	6%
<b>Grade of cell differentiation</b>		<b>Metastasis</b>	
G1	6%	Bone	10%
G2	28%	Visceral	2%
G3	36%	Bone, visceral	2%
Gx	28%	Bone, visceral, lymph node	2%

**Table 3.** Comparison of the genotypic and allelic frequencies of variants between the HBOC and control groups by gene.

Gene	Variant	HBOC Patients				Control			
		Genotype Frequency			MAF	Genotype Frequency			MAF
BCRA 1	rs3092995	C/C	C/G	G/G	G	C/C	C/G	G/G	G
		82%	0%	18%	18%	76%	8%	16%	20%
	rs8176318	C/C	C/T	T/T	T	C/C	C/T	T/T	T
		84%	10%	6%	11%	90%	10%	0%	5%
	rs111791349	G/G	G/A	A/A	A	G/G	G/A	A/A	A
BCRA 2	rs12516	68%	12%	20%	26%	76%	18%	6%	15%
		C/C	C/T	T/T	T	C/C	C/T	T/T	T
	rs15869	82%	4%	14%	16%	84%	16%	0%	8%
		A/A	A/C	C/C	C	A/A	A/C	C/C	C
	rs7334543	84%	6%	10%	13%	82%	18%	0%	9%
		A/A	A/G	G/G	G	A/A	A/G	G/G	G
	c.*457	94%	0%	6%	6%	94%	0%	6%	6%
		A/A	A/C	C/C	C	A/A	A/C	C/C	C
	rs11571836	66%	12%	22%	28%	68%	30%	2%	17%
		A/A	A/G	G/G	G	A/A	A/G	G/G	G
rs75353978 **	82%	4%	14%	16%	82%	14%	40%	11%	
		TT/TT	delTT	delTT	TT/TT	delTT	delTT		
		32%	68%	32%	92%	8%	8%		

\* MAF = Minor Allele Frequency; \*\* rs75353978 SNP is a deletion of TT bases, it is indicated like delTT.





**Figure 1.** Identification of variants' single nucleotide polymorphisms (SNPs). Allelic variants of each 3'UTR region were identified by comparing the alleles carrying the HBOC and healthy patients; blue legends indicate SNP previously reported; red legend indicate a new genetic variant. (A) Comparison of 3'UTR of *BRCA1*; (B) Comparison of 3'UTR of *BRCA2*.

### 3.2. Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) and Allelic Risk

Based on the information obtained, we performed a test for the balance of the Hardy-Weinberg equilibrium, with the purpose of determining if there was independence between the observed alleles and what was expected. The SNPs that were considered for the following studies were rs8176318 and rs12516 for *BRCA1*, and rs15869 and variant c.\*457 for *BRCA2*. In the remaining SNPs, HWE was unbalanced for the control group. Although the most common cause is the genotyping method, we consider that the causes were due to the high migratory flow of the area and its genetic consequences. A significant difference between the groups was found with homozygous minor frequent alleles (MAF) of the SNPs rs111791349 (allele A,  $p = 0.047$ ), rs15869 (allele C,  $p = 0.032$ ), and c.\*457 (allele C,  $p = 0.007$ ), which were considered as a risk for HBOC patients (Table 4 and Table S1).

# Variantes genéticas en la región 3'UTR de *BRCA1* y *BRCA2* y su relación en el mecanismo de microARN en cáncer de mama y ovario hereditario

Diagnostics 2020, 10, 298

7 of 13

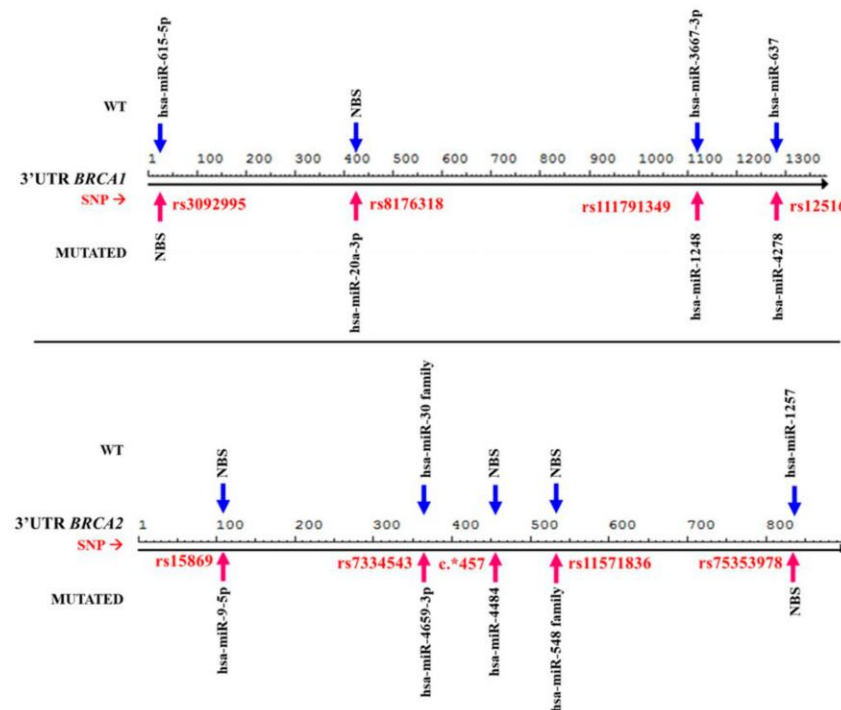
**Table 4.** Tests for association between genetic variants and hereditary breast and ovarian cancer. All tests were carried out with a 95% confidence interval (CI).

Gene	Variant/Alleles	Risk Allele 1				Risk Allele 2			
		Allele Freq. Difference	Heterozygous	Homozygous	Allele Positivity	Allele Freq. Difference	Heterozygous	Homozygous	Allele Positivity
		[11]→[12]	[11]→[12]	[11+]→[12]	[11]→[12+22]	[2]→[1]	[22]→[12]	[22]→[11]	[11+12]→[12]
<i>BRCA1</i>	rs8176318 (C/T)	2.4 (0.8–7.0)	1.1 (0.3–4.0)	7.5 (0.4–149.4)	1.7(0.5–5.7)	0.4 (0.1–1.3)	0.1 (0.01–3.5)	0.1 (0.01–2.7)	0.1 (0.01–2.7)
		0.118 (P)	0.918	0.078	0.372	0.118 (P)	0.1185	0.078	0.079
	rs12516 (C/T)	2.2 (0.9–5.4)	0.3 (0.05–1.3)	15.4 (0.9–277.7)	1.2 (0.4–3.3)	0.5 (0.2–1.1)	0.02 (0.001–0.5)	0.1 (0.004–1.2)	0.1 (0.003–1.0)
<i>BRCA2</i>		0.082 (P)	0.078	<b>0.001</b>	0.79	0.082 (P)	<b>0.001</b>	<b>0.0099</b>	<b>0.006</b>
	rs15869 (A/C)	1.5 (0.6–3.7)	0.3 (0.08–1.3)	10.7 (0.6–200.5)	0.9 (0.3–2.5)	0.7 (0.3–1.6)	0.03 (0.001–0.8)	0.1 (0.005–1.7)	0.1 (0.004–1.51)
		0.366 (P)	0.097	<b>0.032</b>	0.79	0.366 (P)	<b>0.005</b>	<b>0.032</b>	<b>0.0218</b>
<i>c.*457</i> (A/C)		1.9 (0.96–3.8)	0.4 (0.1–1.2)	11.3 (1.4–92.8)	1.1 (0.5–2.5)	0.5 (0.3–1.0)	0.04 (0.004–0.4)	0.1 (0.01–0.7)	0.1 (0.01–0.6)
		0.063 (P)	0.096	<b>0.007</b>	0.832	0.063 (P)	<b>0.0005</b>	<b>0.007</b>	<b>0.0021</b>

Cell contents: odds ratio (95% confidence interval) and p-value. rs8176318: Allele [1] = T; allele [2] = C, rs12516: allele [1] = T; allele [2] = C, rs15869: allele [1] = C; allele [2] = C; c.\*457: allele [1] = C; allele [2] = A. Significant values are indicate in bold.

### 3.3. Presence of Genetic Changes Could Modify miRNA Binding Mechanisms

We determined the effect of the allelic changes in the 3'UTR regions of the *BRCA1* and *BRCA2* genes on the miRNA binding mechanism. Our aim was to establish if the miRNA seed region was maintained and if it was not modifying binding with its usual mRNA, or conversely, if the allelic changes provoked the elimination of recognition sites or created new binding loci. In silico analysis showed that there are trans modifications in miRNA regulatory mechanisms (Figure 2). The changes allow different for miRNAs, considered as oncomiRs, i.e., hsa-miR-1248 and -4278 for *BRCA1* 3'UTR, or the creation of members of the miRNA family binding site, such as hsa-miR-548 in *BRCA2* (Table 5).



**Figure 2.** Comparative map of miRNAs bound between normal (WT) and mutated sequences. Trans modifications can be observed in the miRNA mechanism because of the presence of allelic variants. Arrow blue indicate miRNAs binding site in WT; Arrow red indicate miRNAs bind site into mutations. NBS—site with no miRNA binding site.

**Table 5.** In silico effect of allelic variants on the miRNAs-binding seed regions. Some SNPs modified the sequence regions of the mRNA causing the deletion or creation of miRNA binding sites. Red line indicates a new miRNA binding site created; red cross indicates that a miRNA binding site were deleted.

Gene	Variant	microRNA	$\Delta\Delta G$ (Kcal/mol)	Duplex SNP-miRNA	Effect
<i>BRCA1</i>	rs8176318 (G/T)	hsa-miR-20a-3p	Wt: 0.00	miRNA: 3'-gaaauuCACGAGU-AUUACGUCa-5'	Created
			SNP: -22.70	UTR: 5'-aacctGTGTTCAAAATGCAGa-3'	
	rs12516 (C/T)	hsa-miR-4278	Wt: -18.30	miRNA: 3'-guucccGUUUGGGGAUc-5'	Created
			SNP: -21.60	UTR: 5'-cttcccTAGCCCCCTAg-3'	
<i>BRCA2</i>	rs15869 (A/C)	hsa-miR-9-5p	Wt: -28.30	miRNA: 3'-ugegucucGGGCUUUCGGGGUcA-5'	Eliminated
			SNP: -16.00	UTR: 5'-taggtcttCCCTAGCCCCCTAGt-3'	
	c.*457 (A/C)	hsa-miR-4484	Wt: -14.00	miRNA: 3'-uccuugguuuacUAGCUUAUga-5'	Created
			SNP: -23.20	UTR: 5'-ttatgttgacacATGAGCAAAga-3'	
<i>BRCA2</i>	c.*457 (A/C)	hsa-miR-4484	Wt: -11.10	miRNA: 3'-ACCCCGAAGAGGGCGGAAAA-5'	Created
			SNP: -23.70	UTR: 5'-TGAAATAACATACCCTTTT-3'	

### 3.4. Trans-Mechanisms miRNAs Affect Molecular and Cellular Regulation

A comparative molecular ontology and cellular pathway analysis between the miRNAs that lost their binding sites and the new ones that did bind because SNPs were performed. Previous experimental evidence indicates that there are changes in the metabolic and gene signaling pathways of differentiated controls for each group of miRNAs. The pathways involved in the generation of molecules were characteristic of tumor microenvironments, such as adherents binding, hormonal signaling, hypoxic environments, etc. This was also the case for molecular pathways of genome stabilization and regulation at the cell cycle checkpoints and cell arrest. This proves that the presence of allelic variations in patients modifies the molecular and cellular pathways. For example, miRNAs that bind to normal genotypes regulate the mechanisms of lysine degradation ( $p = 0.0006$ ), HIF-1 signaling ( $p = 0.0118$ ), and the central carbon of cancer metabolism ( $p = 0.0119$ ), simultaneously. However, this regulation ceases to be performed in the presence of other miRNAs. These apparent regulatory control differences suggest that both early tumor development and cancer progression could be indicative of aggressive cancer phenotypes in carrier allelic variants patients.

## 4. Discussion

We observed that more than 50% of patients with HBOC were diagnosed at the disease stage (IIB and IIIA). The Northeastern region of Mexico is one of the areas with the highest morbidity and mortality rates due to breast cancer over 20 years (28.58:100,000), compared with the national average statistics (18.97:100,000) [16,17]. A fundamental analysis in the confirmatory diagnosis of breast cancer is the determination of the expression status of membrane receptors; because of the degree of cancer heterogeneity, these analyses help to determine the prognosis and specific treatment. In addition, oncological treatments should consider specific molecular therapeutic targets. For example, ER<sup>+</sup> and PR<sup>+</sup> patients are eligible for tamoxifen treatment. With the introduction and approval of trastuzumab (Herceptin), over-expressing HER2/neu patients are candidates for its use.

In previous reports, it was observed in central Mexico that 23–25% of HBOC patients were double or triple negative for these receptors. However, in our study, it was observed that about 53% had at least double negatives (36% TNC and 16% double negative), surpassing almost double what was expected [17]. These characteristics are associated with aggressive neoplasia and poor prognosis. This work can be used as an exploratory study of the genetic characteristics of HBOC patients in the region, based on the specific characteristics, allelic and genotypic frequencies, and the new allelic variant identified (c.\*457) with a strong statistical relationship.



Molecularly, miRNAs related to the regulatory changes by 3'UTR mutations of both *BRCA1* and *BRCA2* are related in the mechanisms of neoplastic development. These changes presume a change in metabolic and cellular function, which must be validated by means of luciferase assays in cell cultures [12,18–20]. In the larger study of 3'UTR *BRCA1* in five sample collections, the variants c.\* 528 (G/C), c.\*718 (A/G), c.\*1271 (T/C), c.\*309 (T/C), c.\*379 (G/A), c.\*823 (C/T), and c.\*264 (C/T) decreased the 3'UTR activity in luciferase assays, while variants c.\* 291C>T and c.\* 1139G>T increased the activity. However, none of these were considered pathological [21,22]. Rs3092995 SNP (c.\*36 C/G) was reported in 1998, and the CG and GG alleles were observed in breast cancer cases of African American patients (28%). OR adjusted by age was 3.5 (95% CI, 1.2–10.0); the authors determined that this variant is in a partial linkage imbalance. We found rs3092995 SNP in both the HBOC cases and the controls (18% and 16%, respectively); the like study above explained, rs3092995 was not balanced in the mestizo population of Northeastern Mexico [11].

Our modified results were like those from the analyzes performed by García et al. (2016) in the subgroup of patients of the French national study GENESIS (GENE SYSters), in which patients with family breast cancer were evaluated, with at least one sister diagnosed. They detected in their population the variants c.\*421 (G/T) (MAF = 0.324) and c.\* 1287 (C/T) (MAF = 0.342) for the 3'UTR *BRCA1*, which were also present in our study. In 3'UTR-*BRCA2* variants c.\* 105 (A/C) (MAF = 0.161), c.\*369 (A/G) (MAF = 0.222), and c.\*532 (A/G) (MAF = 0.197) were screened. All the variants were found in patients of Caucasian ethnicity. Historically, the Northeastern region of Mexico has been characterized by a population dynamic in which many people have ancestors in the third or fourth generation from Europe or the Middle East; this could explain the presence of this genetic vestige like a founder mutation [23]. We found a new genetic variant in 3'UTR *BRCA2*, c.\*457 (A/C), which has not been described so far in any other similar studies. This is relevant, because the C allele presents a risk in HBOC patients ( $p = 0.007$ ). This finding is important, given the few mutations described in the 3'UTR *BRCA2*.

Rs-8176318, -12516, and -15869 SNPs were previously found and analyzed in a Chinese population, and they evaluated SNPs' role in the miRNA mechanism; rs15869 demonstrated a suppression of the *BRCA2* expression in MCF7 and MDA-MA-231 cell lines through luciferase assays. The authors suggest that this interaction increases the risk of breast cancer. This can support part of our results, but we should perform similar assays [23,24].

Control of bias in case-control studies is essential. We performed each process in this study with strict quality control and bias in case-control selection, data collection, experiment design and operation, data entry, and the results of statistical analysis. However, a source of possible bias may be because most cases come from the hospital, and this can lead to Berkson's bias. We reduced this type of bias by evaluating only pathologically confirmed cases of newly diagnosed breast cancer patients, and data were collected through the questionnaire through personal interviews. Confusion bias was effectively controlled by strict inclusion criteria and matched controls. However, some limitations in the present study cannot be ignored. The relatively small sample size reduces statistical power, especially in some subgroups.

On the other hand, a factor that may be affecting the HWE of both populations (and the main reason for carrying out this genetic study) is that the Northeastern region of Mexico has characterized from the beginning of the 20th century to date by a high settlement of European populations (Spanish, Ashkenazi Jews, French, and Germans), Middle and Far East (Saudi Arabia, China, Japan, and Korea), and American (due to the border with the United States). Likewise, because of the economic wealth of the region (Monterrey is the city with the highest quality of life index in Latin America), there is a continuous flow of mestizo population from central and southern Mexico, which is genetically different [11]. These reasons make the gene flow dynamics of this region high, and therefore these alleles are on their way to achieve genetic equilibrium. We proposed that some allelic variants may be due to founder genes from all the communities mentioned.

Future findings could be complemented by determining the expression levels of the set of miRNAs presumably being deregulated by mutations in the 3'UTR regions, as well as validating deleted/created miRNA binding sites using assays of the luciferase activity and precipitation of Dicer, among others, in various types of cancer cell lines. It would also be of great importance to establish whether the mutations are germinal and whether they can be traced in groups of families with histories of breast and ovarian cancer, as well as prostate cancer.

With respect to our study, because of the number of sequenced individuals, the statistical findings cannot be extrapolated to the population of Northeastern Mexico (approximately 11.51 million people). However, this work provides preliminary data for the study of specific genetic variants for the 3'UTR regions of *BRCA1* and *BRCA2* genes in this population, the linked miRNAs, and their implication in the fine tuning of the genome.

## 5. Conclusions

Genetic variants in 3'UTR of *BRCA1* and *BRCA2* increased the risk of HBOC by 3.7–15.4 times in the study population. The presence/absence of these polymorphisms may influence the lost/creation of miRNA binding sites, such as hsa-miR-1248 in *BRCA1* 3'UTR or the hsa-miR-548 family binding site in *BRCA2*. Our results provide new evidence of the miRNAs' participation in the pathogenesis of HBOC. However, molecular predictions should be evaluated by a luciferase activity assay or similar assays to demonstrate the deep impact of the allelic variations found in fine molecular regulation. The genetic alterations found and analyzed can support further research that may clarify its effect on *BRCA1* and *BRCA2* genes molecularly and clinically. Future studies should be defined to evaluate miRNAs binding mechanism in order to develop diagnostic, prognostic, and treatment tools based on miRNAs technology. Thus, we consider this exploratory study as a pioneer in the understanding of HBOC in a Mexican mestizo population.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <http://www.mdpi.com/2075-4418/10/5/298/s1>, **Table S1:** Tests for deviation from Hardy-Weinberg equilibrium and tests for association.

**Author Contributions:** Conceptualization, M.M.S.-C., L.E.M.-d.-V., D.R.-P., and I.P.R.-S.; methodology, M.M.S.-C.; software, M.M.S.-C., I.P.R.-S., and I.D.-E.; validation, M.M.S.-C.; formal analysis, M.M.S.-C.; investigation, M.M.S.-C. and I.P.R.-S.; resources, M.M.S.-C., O.A.Z.-V., L.E.M.-d.-V., and D.R.-P.; data curation, I.P.R.-S.; writing (original draft preparation), M.M.S.-C.; writing (review and editing), M.L.M.-F., M.A.G.-G., and I.D.-E.; visualization, I.P.R.-S.; supervision, I.G.-V., I.P.R.-S.; project administration, L.E.M.-d.-V.; funding acquisition, L.E.M.-d.-V. and D.R.-P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by Universidad Autonoma de Nuevo Leon through "Institutional Calls, PAICYT". The doctoral studies scholarship was awarded by the National Science and Technology Council (CONACYT, 387437).

**Acknowledgments:** We thank the laboratory staff of the Department of Genetics of the School of Medicine and the Laboratory of Developmental Biology of the College of Biological Sciences.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Oleg, C.; Bustreo, F. A Month to Remember—Breast Cancer Awareness Month. Promoting Health through the Life-Course 2019. Available online: <https://www.who.int/life-course/news/commentaries/breastcancer/en/> (accessed on 6 November 2019).
2. Lynch, H.T.; Lynch, J.F.; Lynch, P.M.; Attard, T. Hereditary colorectal cancer syndromes: Molecular genetics, genetic counseling, diagnosis and management. *Fam. Cancer* **2008**, *7*, 27–39. [CrossRef] [PubMed]
3. Ding, Y.C.; McGuffog, L.; Healey, S.; Friedman, E.; Laitman, Y.; Paluch-Shimon, S.; Kaufman, B.; SWE-BRCA, F.; Liljegren, A.; Lindblom, A.; et al. A nonsynonymous polymorphism in *IRS1* modifies risk of developing breast and ovarian cancers in *BRCA1* and ovarian cancer in *BRCA2* mutation carriers. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* **2012**, *21*, 1362–1370. [CrossRef] [PubMed]

4. Pruthi, S.; Gostout, B.S.; Lindor, N.M. Identification and management of women with BRCA mutations or hereditary predisposition for breast and ovarian cancer. *Mayo Clin. Proc.* **2010**, *85*, 1111–1120. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
5. Ramus, S.J.; Kartsonaki, C.; Gayther, S.A.; Paul, D.P.; Pharoah, O.M.; Beesley, S.J.; Chen, X.; McGuffog, L.; Healey, S.; Couch, F.J.; et al. Genetic variation at 9p22.2 and ovarian cancer risk for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *J. Natl. Cancer Inst.* **2011**, *103*, 105–116. [\[PubMed\]](#)
6. Moskwa, P.; Buffa, F.M.; Pan, Y.; Panchakshari, R.; Gottipati, P.; Muschel, R.J.; Beech, J.; Kulshrestha, R.; Abdelmohsen, K.; Weinstock, D.M.; et al. miR-182-mediated downregulation of BRCA1 impacts DNA repair and sensitivity to PARP inhibitors. *Mol. Cell* **2011**, *41*, 210–220. [\[CrossRef\]](#)
7. Yang, H.; Jeffrey, P.D.; Miller, J.; Kinnucan, E.; Sun, Y.; Thomä, N.H.; Zheng, N.; Chen, P.-L.; Lee, W.-H.; Pavletich, N.P. BRCA2 function in DNA binding and recombination from a BRCA2-DSS1-ssDNA structure. *Science* **2002**, *297*, 1837–1848. [\[CrossRef\]](#)
8. Chen, K.; Rajewsky, N. Natural selection on human microRNA binding sites inferred from SNP data. *Nat. Genet.* **2006**, *38*, 1452–1456. [\[CrossRef\]](#)
9. Clop, A.; Marcq, F.; Takeda, H.; Pirottin, D.; Tordoir, X.; Bibé, B.; Bouix, J.; Caiment, F.; Elsen, J.-M.; Eyche, F.; et al. A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep. *Nat. Genet.* **2006**, *38*, 813–818. [\[CrossRef\]](#)
10. Ha, T.Y. MicroRNAs in human diseases: From autoimmune diseases to skin, psychiatric and neurodegenerative diseases. *Immune Netw.* **2011**, *11*, 227–244. [\[CrossRef\]](#)
11. Calderón-Garcidueñas, A.L.; Ruiz-Flores, P.; Cerda-Flores, R.M.; Barrera-Saldaña, H.A. Clinical follow up of Mexican women with early onset of breast cancer and mutations in the BRCA1 and BRCA2 genes. *Salud Publica de Mexico* **2005**, *47*, 110–115. [\[CrossRef\]](#)
12. Erturk, E.; Cecener, E.; Polatkan, V.; Gokgoz, S.; Egeli, U.; Tunca, B.; Tezcan, G.; Demirdogen, E.; Ak, S.; Tasdelen, I.; et al. Evaluation of genetic variations in miRNA-binding sites of BRCA1 and BRCA2 genes as risk factors for the development of early-onset and/or familial breast cancer. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **2014**, *15*, 8319–8324. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Lheureux, S.; Lambert, B.; Krieger, S.; Legros, A.; Vaur, D.; Denoyelle, C.; Berthet, P.; Poulain, L.; Hardouin, A. Two novel variants in the 3'UTR of the BRCA1 gene in familial breast and/or ovarian cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **2011**, *125*, 885–891. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Pelletier, C.; Speed, W.C.; Paranjape, T.; Keane, K.; Blitzblau, R.; Hollestelle, A.; Safavi, K.; van den Ouweland, A.; Zelterman, D.; Slack, F.J.; et al. Rare BRCA1 haplotypes including 3'UTR SNPs associated with breast cancer risk. *Cell Cycle* **2011**, *10*, 90–99. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Sole, X.; Guinó, E.; Valls, J.; Iniesta, R.; Moreno, V. SNPStats: A web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics* **2006**, *22*, 1928–1929. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
16. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática (INEGI). *Estadísticas a Propósito del Día Mundial Contra El Cáncer (4 de Febrero)*; Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática, Ed.; Press communication, INEGI: Aguascalientes, Mexico, 2018.
17. Vaca-Paniagua, F.; Alvarez-Gomez, R.M.; Fragoso-Ontiveros, V.; Vidal-Millan, S.; Herrera, L.A.; Cantú, D.; Bargallo-Rocha, E.; Mohar, A.; López-Camarillo, C.; Pérez-Plasencia, C. Full-exon pyrosequencing screening of BRCA germline mutations in Mexican women with inherited breast and ovarian cancer. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e37432. [\[CrossRef\]](#)
18. Quiyono, M.O.; Colin, S.C.; De La Mora, M.T.G.; Galán, M.D.C.C.; Lladó, D.S. Características epidemiológicas del cáncer de mama y ovario hereditario y del cáncer de mama esporádico en una muestra de la población del ISSSTE. *Rev. Esp. Méd. Quir.* **2012**, *17*, 291–299.
19. Atchley, D.P.; Albarracin, C.T.; Lopez, A.; Valero, V.; Amos, C.I.; Gonzalez-Angulo, A.M.; Hortobagyi, G.N.; Arun, B.K. Clinical and pathologic characteristics of patients with BRCA-positive and BRCA-negative breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **2008**, *26*, 4282–4288. [\[CrossRef\]](#)
20. Cao, J.; Luo, C.; Yan, R.; Peng, R.; Wang, K.; Wang, P.; Ye, H.; Song, C.; Oncology, M. rs15869 at miRNA binding site in BRCA2 is associated with breast cancer susceptibility. *Med. Oncol.* **2016**, *33*, 1–9. [\[CrossRef\]](#)
21. Kontorovich, T.; Levy, A.; Korostishevsky, M.; Nir, U.; Friedman, E. Single nucleotide polymorphisms in miRNA binding sites and miRNA genes as breast/ovarian cancer risk modifiers in Jewish high-risk women. *Int. J. Cancer* **2010**, *127*, 589–597. [\[CrossRef\]](#)



22. Brewster, B.L.; Rossiello, F.; French, J.D.; Edwards, S.L.; Wong, M.; Wronski, A.; Whiley, P.; Waddell, N.; Chen, X.; Bove, B.; et al. Identification of fifteen novel germline variants in the *BRCA1* 3'UTR reveals a variant in a breast cancer case that introduces a functional miR-103 target site. *Hum. Mutat.* **2012**, *33*, 1665–1675. [[CrossRef](#)]
23. Garcia, A.I.; Buisson, M.; Damiola, F.; Tessereau, C.; Barjhoux, L.; Verny-Pierre, C.; Sornin, V.; Dondon, M.-G.; Eon-Marchais, S.; GENESIS investigators; et al. Mutation screening of MIR146A/B and *BRCA1/2* 3'-UTRs in the GENESIS study. *Eur. J. Hum. Genet.* **2016**, *24*, 1324–1329. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Newman, B.; Mu, H.; Butler, L.M.; Millikan, R.C.; Moorman, P.G.; King, M.C. Frequency of breast cancer attributable to *BRCA1* in a population-based series of American women. *JAMA* **1998**, *279*, 915–921. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



## ANEXO 1

### Secuencia de 3'UTR de *BRCA1*

>gi|237757283|ref|NM\_007294.3| Homo sapiens breast cancer 1, early onset (BRCA1), transcript variant 1, mRNA

CTGCAGCCAGCCACAGGTACAGAGCCACAGGACCCCAAGAATGAGCTTACAAAGTGGCCTTTCCAGGCCCT  
GGGAGCTCCTCTCACTCTTCAGTCCTTCTACTGTCCTGGCTACTAAATATTTTATGTACATCAGCCTGAAA  
AGGACTTCTGGCTATGCAAGGGTCCCTTAAAGATTTTCTGCTTGAAGTCTCCCTTGGAATCTGCCATGAG  
CACAAAATTATGGTAATTTTTCACCTGAGAAGATTTTAAACCATTAAACGCCACCAATTGAGCAAGATG  
CTGATTCAATTATTTATCAGCCCTATTCTTTCTATTAGGCTGTTGTTGGCTTAGGGCTGGAAGCACAGAGT  
GGCTTGGCCTCAAGAGAATAGCTGGTTTCCCTAAGTTTACTTCTCTAAAACCTGTGTTACAAAGGCAGA  
GAGTCAGACCCTTCAATGGAAGGAGAGTGCTTGGGATCGATTATGTGACTTAAAGTCAGAATAGTCCTTGG  
GCAGTTCTCAAATGTTGGAGTGGAACATTGGGGAGGAAATTCTGAGGCAGGTATTAGAAATGAAAAGGAAA  
CTTGAAACCTGGGCATGGTGGCTCACGCCTGTAATCCCAGCACTTTGGGAGGCCAAGGTGGGCAGATCACT  
GGAGGTGAGGAGTTCGAAACCAGCCTGGCCAACATGGTGAAACCCCATCTCTACTAAAAATACAGAAATTA  
GCCGGTCATGGTGGTGGACACCTGTAATCCCAGCTACTCAGGTGGCTAAGGCAGGAGAATCACTTCAGCCC  
GGGAGGTGGAGGTTGCAGTGAGCCAAGATCATACCACGGCACTCCAGCCTGGGTGACAGTGAGACTGTGGC  
TCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGGAAAATGAACTAGAAGAGATTTCTAAAAGTCTGAGATATATTTGCTAG  
ATTTCTAAAGAATGTGTTCTAAAACAGCAGAAGATTTTCAAGAACCGGTTTCCAAAGACAGTCTTCTAATT  
CCTCATTAGTAATAAGTAAATGTTTATTGTTGTAGCTCTGGTATATAATCCATTCCTCTTAAATATAAG  
ACCTCTGGCATGAATATTTTCATATCTATAAAATGACAGATCCCACCAGGAAGGAAGCTGTTGCTTTCTTTG  
AGGTGATTTTTTTTCCCTTTGCTCCCTGTTGCTGAAACCATACAGCTTCATAAATAATTTTGCTTGCTGAAGG  
AAGAAAAAGTGTTTTTCATAAACCCATTATCCAGGACTGTTTATAGCTGTTGGAAGGACTAGGTCTTCCCT  
AGCCCCCCCCAGTGTCAGGGCAGTGAAGACTTGATTGTACAAAATACGTTTTGTAAATGTTGTGCTGTTA  
ACACTGCAAATAAACTTGGTAGCAAACACTTCCAAA

## ANEXO 2

### Secuencia de 3'UTR de *BRCA2*

> gi|119395733|ref|NM\_000059.3| Homo sapiens breast cancer 2, early onset (BRCA2), mRNA

GCATTTGCAAAGGCGACAATAAATTATTGACGCTTAACCTTTCCAGTTTATAAGACTGGAATATAATTTCA  
AACCACACATTAGTACTTATGTTGCACAATGAGAAAAGAAATTAGTTTCAAATTTACCTCAGCGTTTGTGT  
ATCGGGCAAAAATCGTTTTGCCCCGATTCCGTATTGGTATACTTTTGCTTCAGTTGCATATCTTAAACTAA  
ATGTAATTTATTAACTAATCAAGAAAAACATCTTTGGCTGAGCTCGGTGGCTCATGCCTGTAATCCCAACA  
CTTTGAGAAGCTGAGGTGGGAGGAGTGCTTGAGGCCAGGAGTTCAAGACCAGCCTGGGCAACATAGGGAGA  
CCCCCATCTTTACAAAGAAAAAAAAAAGGGGAAAAGAAAATCTTTTAAATCTTTGGATTTGATCACTACAA  
GTATTATTTTACAAGTGAAATAAACATACCATTTTCTTTTAGATTGTGTCATTAAATGGAATGAGGTCTCT  
TAGTACAGTTATTTTGATGCAGATAATTCCTTTTAGTTTAGCTACTATTTTAGGGGATTTTTTTTAGAGGT  
AACTCACTATGAAATAGTTCTCCTTAATGCAAATATGTTGGTTCTGCTATAGTTCCATCCTGTTCAAAAGT  
CAGGATGAATATGAAGAGTGGTGTTCCTTTTGAGCAATTCTTCATCCTTAAGTCAGCATGATTATAAGAA  
AAATAGAACCCTCAGTGTAACCTAATTCCTTTTTACTATTCCAGTGTGATCTCTGAAATTAAATTACTTC  
AACTAAAAATTCAAATACTTTAAATCAGAAGATTCATAGTTAATTTATTTTTTTTTTCAACAAAATGGTC  
ATCCAAACTCAAACCTTGAGAAAATATCTTGCTTTCAAATTGGCACTGATT

Variantes genéticas en la región 3'UTR de *BRCA1* y *BRCA2* y su relación en el mecanismo de microARN en cáncer de mama y ovario hereditario

### ANEXO 3

Gene	Allele	Frequencies	Cases %	Controls %	P-value (cases vs control)	OR	95% I. C.
3'UTR <i>BRCA1</i>	rs3092995 (c*36 C > G)	Genotype	n = 50	n = 50			
		CC	82	76	0.7184	Reference	
		CG	0	8	0.04282	0.103	0.005-1.978
		GG	18	16	0.93779	1.043	0.365-2.979
		P-value HWE	1.537E-12	1.137E-07			
		Allele					
	rs8176318 (c*421 G > T)	Genotype	n = 50	n = 50			
		GG	84	90	0.1178	Reference	
		GT	10	10	0.91771	1.071	0.289-3.967
		TT	6	0	0.07813	7.494	0.376-14.9405
		P-value HWE	0.0005	0.7097			
		Allele					
	rs111791349 (c*1113 G > A)	Genotype	n = 50	n = 50			
		GG	68	76	0.05402	Reference	
		GA	12	18	0.60965	0.745	0.240-2.311
		AA	20	6	0.04856	3.725	0.946-14.671
		P-value HWE	1.14E-06	0.0375			
		Allele					
	rs12516 (c*1287 C > T)	Genotype	n = 50	n = 50			
		CC	88	88	0.08172	Reference	
		CT	4	16	0.07816	0.07816	0.051-1.279
		TT	14	0	0.00996	1.5361	0.850-27.764
		P-value HWE	1.76E-09	0.5386			
		Allele					

Gene	Allele	Frequencies	Cases %	Controls %	P-value (cases vs control)	OR	95% I. C.
3'UTR <i>BRCA2</i>	rs15869 (c*105 A > C)	Genotype	n = 50	n = 50			
		AA	84	82	0.36601	Reference	
		AC	6	18	0.09686	0.325	0.082-1.288
		CC	10	0	0.03152	10.741	0.576-20.045
		P-value HWE	2.04E-07	0.4843			
		Allele					
	rs733453 (c*369 A > G)	Genotype	n = 50	n = 50			
		AA	94	94	1.0000	Reference	
		AG	0	0	1.0000	1	0.019-5.144
		GG	6	6	1.0000	1	0.192-5.210
		P-value HWE	1.54E-12	1.54E-12			
		Allele					
	c*457 (A > C)	Genotype	n = 50	n = 50			
		AA	66	68	0.06251	Reference	
		AC	12	30	0.09596	0.412	0.143-1.191
		CC	22	2	0.00645	11.333	1.385-92.772
		P-value HWE	6.81E-07	0.6555			
		Allele					
	rs11571836 c*532 (A > G)	Genotype	n = 50	n = 50			
		AA	82	82	0.30085	Reference	
		AG	4	14	0.11308	0.286	0.056-1.458
		GG	14	4	0.11308	3.5	0.686-17.864
		P-value HWE	1.76E-09	0.0439			
		Allele					
	rs7555978 c*838-839 (TT > -)	Genotype	n = 50	n = 50			
		TT	92	32	2.32E-18	Reference	
		- -	8	68	6.38E-10	2.4438	7.495-7.968
		P-value HWE	1.54E-12	1.54E-12			
		Allele					
		TT	0.326	0.923			